



(1) Publication number:

0 222 491 B1

### (12)

### **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(5) Date of publication of patent specification: 15.03.95 (5) Int. CI.<sup>5</sup>: C12N 15/16, C07K 14/575, C12P 21/02, A61K 38/22,

21) Application number: 86307586.7

2 Date of filing: 02.10.86

- Nucleic acid encoding the alpha or beta chains of inhibin and method for synthesizing polypeptides using such nucleic acid.
- Priority: 03.10.85 US 783910
   07.02.86 US 827710
   12.09.86 US 906729
- Date of publication of application: 20.05.87 Bulletin 87/21
- 45 Publication of the grant of the patent: 15.03.95 Bulletin 95/11
- Designated Contracting States:
   AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE
- (56) References cited: WO-A-86/00078 WO-A-86/06076

Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 129 (1985), pages 396-403, K. Miyamoto

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 83, no.16, August 1986, Baltimore, USA; K.E. MAYO et al., pages 5849-5853

Proprietor: GENENTECH, INC. 460 Point San Bruno Boulevard South San Francisco California 94080 (US)

A61K 39/395

- Inventor: Mason, Anthony John 1206 6th Avenue
   San Francisco
   California 94122 (US)
   Inventor: Seeburg, Peter Horst
   Erzazkerweg 5
   69 Heldelberg (DE)
- Representative: Stuart, Ian Alexander et al MEWBURN ELLIS York House 23 Kingsway London WC2B 6HP (GB)

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid (Art. 99(1) European patent convention).

NATURE, vol. 318, 19/26 Dec. 1985, New York, London; A.J. MASON et al, pages 659-663

NATURE, vol. 321, 19 June 1986, New York, London; W. VALE et al., pages 776-779

NATURE, vol. 321, 19 June 1986, New York, London, N.LING et al., pages 779-782

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, no. 12, June 1985, Baltimore, USA; C.H.LI et al., pages 4041-4044

FEBS LETTERS, vol. 175, no. 2, October 1984, Amsterdam; N.G. SEIDAH et al., pages 349-355

### Description

50

### **BACKGROUND**

This invention relates to methods for making proteins in recombinant cell culture which contain the  $\alpha$  or  $\beta$  chains of inhibin. In particular, it relates to methods for obtaining and using DNA which encodes inhibin, and for making inhibin variants that depart from the amino acid sequence of natural animal or human inhibins and the naturally-occurring alleles thereof.

Inhibin is a protein produced in the gonad which acts specifically at the pituitary level to inhibit the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH). The existence of inhibin was first postulated by McCullagh in 1932 ("Science" 76: 19-20). Such preferential regulation of the gonadotropin secretion has generated a great deal of interest and has prompted many laboratories in the past fifty years to attempt to isolate and characterize this substance from extracts of testis, spermatozoa, rete testis fluid, seminal plasma and ovarian follicular fluid, using various bioassays. Although many reports have appeared in the literature claiming the purification of inhibin-like material with molecular weights ranging from 5,000 to 100,000 daltons, subsequent studies have shown that these substances were not homogenous, did not have the high specific activity expected of true inhibin and/or failed to exhibit the molecular characteristics of inhibin as described herein (de Jong, Inhibin-Factor Artifact, "Molecular & Cellular Endocrin." 13: 1-10 (1979); Sheth et al., 1984, "F.E.B.S." 165(1) 11-15; Seidah et al., 1984, "F.E.B.S." 175(2):349-355; Lilja et al., March 1985, "F.E.B.S." 182(1):181-184: Li et al., June 1985, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 82:4041-4044; Seidah et al., "F.E.B.S." 167(1):98-102; and Beksac et al., 1984, "Intern. J. Andrology" 7:389-397).

A polypeptide having inhibin activity was purified from bovine or ovine follicular fluid (PCT 86/00078, published January 3, 1986). This protein was reported to have a molecular weight of 56,000±1,000 on SDS-PAGE and was dissociable into two subunits having apparent molecular weights of 44,000±3,000 and 14,000±2,000. Amino terminal sequences for each subunit were described.

Miyamoto, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 129(2), 1985, 396-403 disclose isolation of at least four inhibin-like proteins from porcine follicular fluid. One of Mr 32K was further separated into bands I, II and III. Band II was reduced and dissociated into two bands of Mr 20K and 13K having N-terminal sequences Ser-Thr-Ala-Pro and Gly-Leu-Glu-Cys respectively.

EP-A-210 461 (Ajinomoto) which is part of the state of the art by virtue of Art 54(3)EPC discloses isolation of a polypeptide from malignant human monocytic cells. The polypeptide had a molecular weight of 25±1KD under non-reducing, and 16±1KD under reducing SDS electrophoresis. The amino terminal sequence and that of a cyanogen bromide cleavage fragment of the 16KD polypeptide were determined.

WO86/06076 (Biotechnology Australia) which is part of the state of the art by virtue of Art. 54(3)EPC discloses DNA sequences encoding inhibin.

Two proteins both having a molecular weight of about 32,000 daltons and having inhibin activity have been successfully isolated from porcine follicular fluid. Purification of porcine inhibin to substantial homogeneity, ie. about 90% by weight of total protein in the fraction, was achieved through a combination of protein separation procedures including heparin-Sepharose affinity chromatography, gel filtration and reverse-phase, high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

These proteins were isolated to substantial homogeneity from material obtained from swine and are referred to as Protein A and Protein B. Each protein has a molecular weight of about 32,000 daltons (32K) and is composed of two polypeptide chains having molecular weights of 18,000 and 14,000 daltons, respectively, the chains being linked together in the hormonally-active protein by disulfide bonding. The amino-terminal amino acid residue sequence of the 18,000 daltons (18K) or alpha chain of both proteins was determined to be

Ser-Thr-Ala-Pro-Leu-Pro-Trp-

Pro-Trp-Ser-Pro-Ala-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Pro-Glu-Glu-Pro-Ala-Val.

The amino-terminal amino acid residue sequence of the 14,000 dalton (14K) or beta chain of Protein A was determined to be

Gly-Leu-Glu-X-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-X-X-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala

and of Protein B was determined to be

Gly-Leu-Glu-X-Asp-Gly-Arg-Thr-Asn-

Leu-X-X-Arg-Gln-Gln-Phe-Phe-Ile-Asp-Phe-Arg-Leu.

Proteins A and B have been completely characterized. Each 32K protein exhibits inhibin activity in that it specifically inhibits the basal secretion of FSH but does not inhibit secretion of luteinizing hormone (LH). The individual chains were not hormonally-active.

After the filing of the parent application hereto, inhibin B-chain dimers were shown to exist in follicular fluid as naturally-occurring substances, termed activin, which are capable of stimulating FSH release by rat anterior pituitary cells (Vale et al., 1986, "Nature" 321:776-779 and Ling et al., 1986, "Nature" 321:779-782).

The amino acid sequence of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin from humans remained unknown until the invention herein. The large quantities of human follicular fluid required to parallel the studies conducted with animal inhibins are not readily available, nor is there any assurance that human and animal inhibins would be sufficiently similar that purification using a parallel procedure would be effective. Accordingly, methods are needed for determining the characteristics and amino acid sequence for human inhibin.

Also needed are economical methods for making the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin in large quantities, preferably entirely and completely free of proteins from the species homologous to the inhibin in question, which inhibin preferably also is biologically active.

These and other objects will be apparent from consideration of the invention as a whole.

### SUMMARY

30

5

Nucleic acid now has been isolated and cloned in replicable vectors which encodes the mature porcine and human  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin and their precursor prepro and pro forms. Sequencing of inhibin-encoding cDNA has led to the identification of prodomain regions located N-terminal to the mature inhibin chains that represent coordinately expressed biologically active polypeptides. The prodomain regions or prodomain immunogens are useful in monitoring preproinhibin processing in transformant cell culture or in experiments directed at modulating the clinical condition or reproductive physiology of animals. Thus  $\alpha$  or  $\beta$  chain nucleic acid is used to prepare prodomain sequences from the precursor forms of the inhibin chains, to transform host cells for the recombinant expression of mature inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains, and in diagnostic assays. In particular, regions from inhibins  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains are expressed in recombinant cell culture by a method comprising ligating the nucleic acid encoding the region into a replicable vector under the control of a promoter, transforming a host cell with the vector, culturing the host cell and recovering the prodomain, activin or inhibin from the cultured cell. Inhibin, activin and prodomains produced by the method of this invention are entirely free of homologous source proteins and can be produced in biologically active form.

The nucleic acids identified herein encode the  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chains of porcine or human inhibin. Recombinant cells are transformed to express  $\alpha\beta_A$  or  $\alpha\beta_B$  inhibins, or to express  $\beta$ -chain heterodimers or homodimers (which are collectively referred to in the literature as activin).  $\beta$ -chain dimers as products of recombinant cells expression are free of homologous proteins with which they ordinarily are associated in nature.

Inhibin or activin and their nontoxic salts, combined with a pharmaceutically acceptable carrier to form a pharmaceutical composition, are administered to mammals, including humans, for control of fertility. Administration of inhibin decreases fertility in female mammals and decreases spermatogenesis in male mammals, and administration of a sufficient amount induces infertility. Inhibin is also useful in tests to diagnose infertility. Activin has been shown in the literature to be capable of stimulating FSH release from pituitary cells and accordingly is useful as a fertility inducing therapeutic.

The method of this invention also facilitates the convenient preparation of inhibin, activin and prodomain variants having primary amino acid sequences and/or glycosylation differing from the native analogues, in particular fusions of immunogenic peptides with inhibin, activin or prodomain sequences.

### Brief Description of the Drawings

Fig. 1A is a schematic representation of the porcine  $\alpha$ -chain mRNA. Overlapping cDNA clones used in the sequence determination are shown above the diagram of the mRNA structure. Black boxes on the 3' ends of  $\lambda$  clones indicate that these clones were obtained by specific priming. Untranslated sequences are represented by a line, coding sequences are boxed. The unfilled portion represents the coding region for the signal peptide and pro-sequences, and the cross-hatched areas indicates the 134 amino acid  $\alpha$ -chain. The scale is in nucleotides from the 5' end of the longest cDNA clone.

Fig. 1B shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of the porcine  $\alpha$ -chain precursor. Nucleotides are numbered at the left and amino acids are numbered throughout. The amino acid sequence underlined was used to design a long synthetic DNA probe. The 364 amino acid precursor includes a hydrophobic signal sequence, a pro-region, and the mature  $\alpha$ -chain (amino acids 231-364). The proteolytic processing site Arg-Arg (black bar) immediately precedes the NH2-terminus of the mature alpha chain. Several other putative dibasic processing sites present in the pro-region are indicated by open bars. The two potential N-linked glycosylation sites are shown by the cross-hatched bars. The AATAAA box close to the 3' end of the mRNA is underlined.

Fig.2A is a schematic representation of the porcine  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunit mRNAs with coding sequences boxed. The  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunits (dashed) are encoded towards the 3' end of the coding sequences. The 3' and 5' untranslated regions are shown as a line. The length of the 5' and 3' untranslated region of the  $\beta_B$  subunit mRNA is inferred from the size of the mRNA (Fig. 3) and its obvious similarity to the  $\beta_A$  mRNA. Tentative regions of the cDNAs are shown as dashed in the diagram. The relative positions of the overlapping oligo-dT primed cDNA clones and the randomly primed clones ( $\lambda_B N \beta_B N \beta$ 

Fig. 2B is the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the porcine inhibin  $\beta$ -subunit precursors. The  $\beta_B$  sequence is aligned with the  $\beta_A$  sequence for maximum homology. The NH<sub>2</sub>-terminal of the  $\beta$ -subunit precursors are indicated by bracket and arrows. Cysteine residues are shaded, possible processing sites are indicated by open bars, and a potential glycosylation site is shown by the cross-hatched box. A very GC-rich region present 3' to the termination codon intron sequences is underlined and overlined in both sequences. Amino acid sequences used to design oligonucleotide probes are underlined, as is the AATAAA polyadenylation signal. There was one nucleotide difference between  $\lambda$ PIN- $\beta_A$ 8 and other clones covering this area. A G-to-A change causes a change of amino acid 278 from a glycine to a serine. The proteolytic processing site Arg Arg Arg Arg (black bar) immediately precedes the NH<sub>2</sub> terminus of the mature  $\beta_A$  subunit, with the prosequences located upstream. The amino acids for the  $\beta_A$  subunit only are numbered.

Fig. 3 is a Northern blot analysis of porcine ovarian mRNA with  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunit cDNA hybridization probes. Lanes a, b, c, d, and f are polyA mRNA and e and g are total RNA. The position of the 28S and 18S ribosomal RNAs are shown. Lanes a, d, and e were hybridized with an  $\alpha$ -subunit cDNA probe; lanes d, e and g with a  $\beta_A$  subunit specific probe, and lane c with a  $\beta_B$  subunitspecific probe. The  $\alpha$ -subunit mRNA is approximately 1.5 kb, the  $\beta_A$  subunit mRNAs are approximately 4.5 kb. The hybridizations shown in lanes a, b, and c were performed with probes of approximately equal length and specific activity in order to judge relative mRNA levels.

Fig. 4A is a comparison of the human  $\beta$ -TGF amino acid sequence and porcine inhibin  $\beta_A$  and  $\beta_B$  amino acid sequences. The sequences were aligned around the cysteine residues. Identical residues are boxed, while conservative changes are designated by an asterisk.

Fig. 4B compares the  $\alpha$ -subunit sequence with the  $\beta_A$ -inhibin sequence.

Fig. 5 depicts the construction of a representative recombinant expression plasmid for porcine inhibin.

Fig. 6 shows the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the human  $\alpha$ -inhibin cDNA. The 335 amino acid pro-or inhibin sequence is numbered from the hypothesized signal cleavage site. Sixteen amino acids of the signal sequence are numbered -1 through -16. Homology with the porcine sequence predicts a further 12 amino acid residues in the signal sequence. In this and other figures, putative dibasic processing sites are shown by the open bars, glycosylation sites indicated by cross-hatched bars, and amino terminal mature chain processing sites are depicted as black bars. The poly(A) additional signal sequence is underlined. Cysteine residues are shaded.

Fig. 7 is a comparison of the human and porcine  $\alpha$ -inhibin protein sequences. Spaces are introduced to maximize the homology; positions of non-identity are indicated by stars. Numbering is as for the porcine sequence, which is one amino acid shorter than the human.

Fig. 8 shows that the nucleotide and deduced amino acid sequence of the human  $\beta_A$  inhibin signal sequence (residues -28 through -1) is 28 amino acids with the precursor being 378 amino acids in length.

The basic processing site is indicated by a black bar, and a potential glycosylation site in the precursor is indicated by a cross-hatched bar above the sequence. Cysteine residues are shaded.

Fig. 9 illustrates the nucleotide and deduced amino acid sequence of human  $\beta_B$  inhibin cDNA. The sequence commences at a cysteine residue (position 7), which lines up with the cysteine present at residue 7 in the  $\beta_A$  sequence (see Fig. 8). The processing site for the mature  $\beta_B$  inhibin is shown as a black bar and a potential glycosylation site as a cross-hatched bar. Cysteine residues are shaded.

### **DETAILED DESCRIPTION**

The polypeptides of this invention are the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin, as well as their multimer forms (activin and inhibin), their prepro forms and their prodomains, together with glycosylation and/or amino acid sequence variants of each chain or form thereof. Inhibin (including alleles) from human or animal sources inhibits the basal release of FSH but not of LH from anterior pituitary cells while activin does the opposite (hereinafter referred to as "hormonally active" activin or inhibin).

Generally, amino acid sequence variants will be substantially homologous with the relevant portion of the porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain sequences set forth in Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9. Substantially homologous means that greater than about 70% of the primary amino acid sequence of the candidate polypeptide corresponds to the sequence of the porcine or human chain when aligned in order to maximize the number of amino acid residue matches between the two proteins. Alignment to maximize matches of residue includes shifting the amino and/or carboxyl terminus, introducing gaps as required and/or deleting residues present as inserts in the candidate. For example, see Figs. 2B and 7 where the  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunits or human and porcine  $\alpha$ -inhibin sequences are aligned for maximum homology. Typically, amino acid sequences variants will be greater than about 90% homologous with the corresponding native sequences shown in Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9.

Variants that are not hormonally-active fall within the scope of this invention, and include polypeptides that may or may not be substantially homologous with either a mature inhibin chain or prodomain sequence, but which are 1) immunologically cross-reactive with antibodies raised against the native counterpart or 2) capable of competing with such native counterpart polypeptides for cell surface receptor binding. Hormonally inactive variants are produced by the recombinant or organic synthetic preparation of fragments, in particular the isolated  $\beta$  chains of inhibin, or by introducing amino acid sequence variations so that the molecules no longer demonstrate hormonal activity as defined above.

Immunological or receptor cross-reactivity means that the candidate polypeptide is capable of competitively inhibiting the binding of the hormonally-active analogue to polyclonal antisera raised against the hormonally-active analogue. Such antisera are prepared in conventional fashion by injecting goats or rabbits S.C. with the hormonally-active analogue or derivative in complete Freunds adjuvant, followed by booster intraperitoneal or S.C. injections in incomplete Freunds.

Variants that are not hormonally active but which are capable of cross-reacting with antisera to hormonally-active inhibin, activin, or prodomains are useful (a) as reagents in diagnostic assays for the native analogues or their antibodies, (b) when insolubilized in accord with known methods, as an agent for purifying anti-native analogue antibodies from antisera, and (c) as an immunogen for raising antibodies to hormonally-active analogues.

This invention includes the pro and/or prepro sequences of the inhibin  $\alpha$  or  $\beta$  chain precursors, or their immunologically or biologically active fragments, substantially free of the corresponding mature inhibin chains. These sequences for porcine and human inhibin are shown in Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9. The prepro sequence for the porcine  $\alpha$  subunit precursor is the polypeptide comprised by residues 1 to about 230, while the  $\beta_A$  subunit pro sequence is comprised by residues 1 to about 308. These sequences shall be referred to herein as encompassing prodomain sequences.

The  $\alpha$  and  $\beta$  subunit prodomain sequences are comprised of several domains bounded by proteolysis sites, any one of which is synthesized herein separately or in combination with other domains. The principal porcine  $\beta_A$  domains fall within residues 1 to about 70 (domain I), about 70 to about 110 (domain II), about 110 to about 180 (domain III), about 180 to about 260 (domain IV), and about 270 to about 309 (domain V). In particular, the porcine  $\beta_A$  domains are

### GHSAAPDCPSCALATLPKDVPNSQPEMVEAV,

HILNMLHIKKRPDVTQPVPKAALLNAI, LHVGKVGENGYVELEDDIG,
AEMNELMEQTSEIITFAEAGRARKTLRFEISKEGSDLSVVERAEIWLFKVPKANRTRTKV
SIRLFQQQ, PQGSADAGEEAEDVGFPEEKSEVLISEKVVDA,
STWHIFPVSSSIQRLLDQGKSALDIRTACEQCHETGASLVLLG, and
GHSAAPDCPSCALATLPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQPVPKAALLNAI.

The porcine  $\beta_B$  domains comprise RAAHILLHAVRVSGWLNL as well as homologous  $\beta$  domains having the same sequences. The porcine  $\alpha$  domains comprise

### GPELDRELVLAKVRALFLDALGPPAVTGEGGDPGV and

GSEPEEDVSQAILFPATGARCGAEPAAGELAREAEEGLFTYVGRPSQHTHSRQVTSAQLWFHTGL DRQGMAAANSSGPLLDLIALSSRGPVAVPMSLGQAPPRWAVLHLAASALPLLTHPVLVLLLRCPLC SCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERA.

15

A typical combination domain polypeptide would be  $\beta_A$  domain II linked at its C-terminus to the NH<sub>2</sub>-terminus of  $\beta_A$  domain III. In addition, these domains are fused together by the proteolysis sites found in the sequences shown in Figs. 1B or 2B, by 1 to 4 residue polypeptides that are resistant to hydrolysis (for example, glutaminyl or histidyl residues), or are directly fused, whereby, in all three instances, combination domain polypeptides are produced.

Principal human  $\alpha$  chain prodomains are approximately residues 30-199 and 1 to 29, human  $\beta$ A prodomains are approximately residues 1-30, 32-40, 43-59, 62-80, 83-185 and 186-230 while human  $\beta_B$  prodomains are approximately residues 1-13, 15-30, 32-59, 62-145, 148-195 and 198-241 (referring to the numbering system adopted in Figs. 6, 8 and 9, respectively). Combination prodomain polypeptides are within the scope hereof, for example, the  $\beta_A$  prodomain at about 43-80, and  $\beta_B$  prodomains at about 1-30 and about 32-145. The preferred human  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chain prodomains are about residues 1-29, about 43-80 and about 1-30, respectively.

The intact isolated prepro or prodomain  $\beta_A$ ,  $\beta_B$  or  $\alpha$  sequences are best synthesized in recombinant cell culture. The individual subcomponent domains are synthesized by routine methods of organic chemistry or by recombinant cell culture. They then are labelled with a radioisotope or other detectable group such as an enzyme or fluorophore in accord with known methods and used in standard competitive immunoassays to detect the levels of prepro or pro forms of inhibin, including individual domains, in transformants with DNA encoding such forms or their precursors. This assay is useful in determining whether proteolytic hydrolysis of proinhibin is occurring in the host transformants or their culture media. The assay also is useful in determining whether a rate limiting step in recombinant synthesis is translation of mRNA into the prepro forms or processing of the prepro forms into mature inhibin. For example, high levels of prepro or pro inhibin in cell lysates, but relatively low levels of secreted mature inhibin, would suggest that the host cell is adequately transcribing and translating the inhibin DNA, but is not processing the precursors at an adequate rate. Thus, in this case one would select an alternate host cell rather than concentrating on improving the transcription or translation efficiency of the transforming plasmid, e.g., by selecting an alternate promoter. The prodomain sequences also are believed to be involved in coordinate modulation of animal physiology in reproductive cycles and fertility.

Amino acid sequence variants are any one of 1) hormonally-active, 2) cross reactive with antibodies raised against mature inhibin or prodomain  $\alpha$  or  $\beta$  chain sequences, or 3) cross-reactive with inhibin/activin cell surface receptors, but are characterized by a primary amino acid sequence that departs from the sequence of natural inhibins or prodomain sequences. These derivatives ordinarily are prepared by introducing insertions, deletions or substitutions of nucleotides into the DNA encoding the target DNA to be modified in order to encode the variant, and thereafter expressing the DNA in recombinant cell culture. Polypeptides having up to about 100-150 residues also are conveniently prepared by in vitro synthesis. Such variants are characterized by the predetermined nature of the variation, a feature that sets them apart from naturally occurring allelic or interspecies variation. The variants may exhibit the same qualitative biological activity as the naturally-occurring analogue or may act antagonistically towards such analogues.

While the site for introducing a sequence variation is predetermined, it is unnecessary that the mutation <u>per se</u> be predetermined. For example, in order to optimize the performance of mutation at a given site, random mutagenesis may be conducted at the target codon or region and the expressed inhibin mutants screened for the optimal combination of desired activity. Techniques for making substitution mutations at predetermined sites in DNA having a known sequence is well known, for example M13 primer mutagenesis.

Mutagenesis is conducted by making amino acid insertions, usually on the order of about from 1 to 10 amino acid residues, or deletions of about from 1 to 30 residues. Deletions or insertions preferably are made in adjacent pairs, i.e. a deletion of 2 residues or insertion of 2 residues. Substitutions, deletions, insertions or any subcombination may be combined to arrive at a final construct. Insertions include amino or carboxyl-terminal fusions, e.g. a hydrophobic extension added to the carboxyl terminus. Preferably, however, only substitution mutagenesis is conducted. Obviously, the mutations in the encoding DNA must not place the sequence out of reading frame and preferably will not create complementary regions that could produce secondary mRNA structure.

Not all mutations in the DNA which encode the polypeptides herein will be expressed in the final secreted product. For example, a major class of DNA substitution mutations are those in which a different secretory leader or signal has been substituted for the native porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain secretory leader, either by deletions within the leader sequence or by substitutions, wherein most or all of the native leader is exchanged for a leader more likely to be recognized by the intended host. For example, in constructing a procaryotic expression vector the porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain secretory leader is deleted in favor of the bacterial alkaline phosphatase or heat stable enterotoxin II leaders, and for yeast the leader is substituted in favor of the yeast invertase, alpha factor or acid phosphatase leaders. However, the porcine and human secretory leaders are recognized by many heterologous higher eukaryotic cells. When the secretory leader is "recognized" by the host, the host signal peptidase is capable of cleaving a fusion of the leader polypeptide fused at its C-terminus to the mature inhibin or prodomain such that mature inhibin or prodomain polypeptide is secreted.

Another major class of DNA mutants that are not expressed in final form as amino acid sequence variations are nucleotide substitutions made in the DNA to enhance expression, primarily to avoid 5' stem and loop structures in the transcribed mRNA (see de Boer et al., EP 75,444A) or to provide codons that are more readily transcribed by the selected host, e.g. the well-known preference codons for E. coli or yeast expression. These substitutions may or may not encode substituted amino acid residues, but preferably do not

Insertional and deletional amino acid sequence variants are proteins in which one or more amino acid residues are introduced into or removed from a predetermined site in the target inhibin, activin, prodomain or proform of inhibin or activin. Most commonly, insertional variants are fusions of heterologous proteins or polypeptides to the amino or carboxyl terminus of the  $\alpha$  or  $\beta$  chains, the prodomains or other inhibin derivatives. Immunogenic derivatives are made by fusing an immunogenic polypeptide to the target sequence, e.g. a prodomain polypeptide, by synthesis in vitro or by recombinant cell culture transformed with DNA encoding the fusion. Such immunogenic polypeptides preferably are bacterial polypeptides such as trpLE, beta-galactosidase and the like, together with their immunogenic fragments. Other insertions entail inserting heterologous eukaryotic (e.g. the herpes virus gD signal) or microbial secretion signal or protease processing sequences upstream from the NH<sub>2</sub>-terminus of the protein to be secreted. Deletions of cysteine or other labile residues also may be desirable, for example in increasing the oxidative stability of the  $\alpha$  or  $\beta$  chain. Deletion derivatives will produce  $\alpha$  or  $\beta$  chain fragments. Such fragments, when biologically or immunologically active, are within the scope herein. For instance, a fragment comprising  $\beta_B$  or  $\beta_A$  residues about from 11 to 45 (numbered from mature Gly<sub>1</sub>) is to be included within the scope herein.

Immunogenic conjugates of prodomain polypeptides, inhibin and activin are readily synthesized in recombinant cell culture as fusions with immunogenic polypeptides, e.g. beta-lactamase or viral antigens such as herpes gD protein, or by preparation of the polypeptides in unfused form (by recombinant or in vitro synthetic methods) followed by covalent cross-linking to an immunogenic polypeptide such as keyhole limpet hemocyanin or STI using a divalent cross-linking agent. The immunogenic polypeptides are formulated with a vaccine adjuvant, e.g. alum or Freunds. Methods for preparing proteins in adjuvants and for cross-linking are well-known per se and would be employed by one skilled in the art, as are methods for vaccinating animals. The immunogenic conjugates are useful in preparing antibodies to the prodomain region for use in monitoring inhibin manufacture or for in vivo vaccination with the objective of raising antibodies capable of modulating animal physiology in reproductive cycles and fertility. Typically, the prodomain or its immunogen is administered in varied doses to fertile laboratory animals or swine and the reproductive cycles and fertility of the animals monitored, together with assays of serum levels of anti-immunogen or prodomain by routine competitive or sandwich immunoassay.

Substitution derivatives are produced by mutating the DNA in a target codon, so that thereafter a different amino acid is encoded by the codon, with no concomitant change in the number of residues present in the molecule expressed from the mutated DNA. Substitutions or deletions are useful for example in increasing the stability of the proteins herein by eliminating proteolysis sites, wherein residues are substituted within or adjacent to the sites or are deleted from the sites, or by introducing additional disulfide bonds through the substitution of cysteine for other residues. Substitutions are useful for facilitating the synthesis or recovery of mature or prodomain  $\alpha$  or  $\beta$  chains. For example, methionine residues within the mature inhibin sequences are substituted or deleted, prepro sequences deleted, methionine inserted at the -1 site immediately NH<sub>2</sub> terminal to the mature NH<sub>2</sub> terminal residue and another sequence inserted N-terminal to the exogenous methionine. The inhibin derivative in this case is expressed as a fusion having an intermediate methionyl residue, which in turn is cleaved at this residue by cyanogen bromide in accordance with known practice. The mature inhibin derivative released from the fusion is recovered.

Exemplary porcine inhibin derivatives are  $[Asn_{266}->Gln]lnh_{\alpha}$  (to remove the putative glycosylation site),  $[Cys_{325} \text{ or } Cys_{324}->\Delta]lnh_{\alpha}$ ,  $[Cys_{363}->\Delta]lnh_{\alpha}$ ,  $[Lys_{322} \text{ or } Lys_{322}->\Delta]lnh_{\beta}_{A}$  or  $[Lys_{322}->His \text{ or } Ser]lnh_{\beta}_{A}$  (to inactivate a potential proteolysis site),  $[Lys_{315}->Arg; Val_{316}->Thr] lnh_{\beta}_{A}$  (to create a  $\beta_{\alpha}/\beta_{\beta}$  hybrid),  $[Cys_{388} \text{ or } Cys_{390}->\Delta]lnh_{\beta}_{A}$ ,  $[Lys_{411}->Gln]lnh_{\beta}_{A}$ ,  $[Arg_{315}->Lys, Val_{316}->Thr]lnh_{\beta}_{B}$  (to create a  $\beta_{\beta}/\beta_{A}$  hybrid),  $[Cys_{319} \text{ or } Cys_{320}->\Delta]lnh_{\beta}_{B}$   $[Pro_{381} \text{ Gly}_{382}-> Pro \text{ Phe Gly}]lnh_{\beta}_{B}$ , and  $[Arg_{395}->Gln]lnh_{\beta}_{B}$ , wherein lnh is an abbreviation for inhibin and the residue members for  $lnh_{\beta}_{B}$  are those used for the corresponding  $lnh_{\beta}_{A}$  residue (see Fig. 2B).

The  $lnh\beta_A$  amino acid positions which are principal candidates for mutational substitution or deletion (or adjacent to which residues may be inserted) include residues 293-297, 364-376 and 387-398 (Fig. 8). Preferably, the proline, cysteine and glycine residues within these sequences are not modified. Candidates having greater potency than inhibin or activin, or which serve as inhibin or activin antagonists, are identified by a screening assay wherein the candidate is diluted into solutions containing constant amounts of inhibin or activin and the compositions assayed in the rat pituitary cell assay. Candidates which neither antagonize or agonize inhibin or activin are screened for utility in immunoassays for inhibin or activin by measuring competitive immunodisplacement of labelled inhibin or activin of the native hormones from polyclonal antibody directed against the native hormones. Exemplary contemplated sequence variants of Inh BA include Phe<sub>302</sub>->lle or Leu; Gln<sub>297</sub>->Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>->Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>->Tyr or Phe; !le<sub>311</sub>->Phe or Val; Tyr317->Trp or Thr; His318->Lys; Ala319->Ser; Asn320->Gln, Tyr or His; Tyr321->Thr or Asp, Phe340->Tyr (a TGF-β/β<sub>A</sub> intrachain hybrid); His<sub>353</sub>->Asp; His<sub>353</sub>->Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>->Tyr; Val<sub>364</sub>->Phe; Val<sub>364</sub>-> >Leu; Tyr375->Thr; Tyr376->Trp; Asn389->Gln, His or Lys; Ile391->Leu or Thr; Met390 ->Leu or Ser; Val392->Phe, Glu, Thr or Ile. Comparable modifications are made in the human  $\beta_B$  chain. For example,  $lnh\beta_A$ contains a phenylalanyl residue at position 302, and  $lnh\beta_B$  also contains a phenylalanyl residue at a homologous position (264, Fig. 9) when aligned in the same fashion as is shown for porcine  $\beta_B$  in Fig. 4A. Thus, since the Phe<sub>302</sub> residue of  $\beta_A$  is described above as substituted by isoleucinyl or leucinyl, the Phe<sub>264</sub> of  $\beta_B$  is substituted with the same residues.

A factor in establishing the identity of a polypeptide as inhibin, activin or an inhibin variant is the ability of antisera which are capable of substantially neutralizing the hormonal activity of mature inhibin or activin to also substantially neutralize the hormonal activity of the polypeptide in question. However it will be recognized that immunological identity and hormonal activity are not necessarily coextensive. For example, a neutralizing antibody for inhibin may not bind a candidate protein because the neutralizing antibody happens to not be directed to specifically bind a site on inhibin that is critical to its activity. Instead, the antibody may bind an innocuous region and exert its neutralizing effect by steric hinderance. Therefore a candidate protein mutated in this innocuous region might no longer bind the neutralizing antibody, but it would nonetheless be inhibin in terms of substantial homology and biological activity.

It is important to observe that characteristics such as molecular weight, isoelectric point and the like for a native or wild type mature inhibin or activin obtained from follicular fluid or other tissue sources are descriptive only for the native form. Variants contemplated by the foregoing definition will include other polypeptides which will not exhibit all of the characteristics of native analogue. For example, inhibin derivatives like the insertion mutants, deletion mutants, or fusion proteins described above will bring inhibin outside of the molecular weight established for the corresponding native inhibin because fusion proteins with mature inhibin or proinhibin itself as well as insertion mutants will have a greater molecular weight than native, mature inhibin. On the other hand deletion mutants of native, mature inhibin will have a lower molecular weight. Finally, post-translational processing of preproinhibin chains in heterologous cell lines may not be accomplished with the fidelity exercised by the homologous host cell, thereby resulting in some variation in the amino termini of the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. This variation may be encountered as residual prosequence remaining with the mature protein, or the loss of several mature residues that are cleaved off

with the prosequence. The same is true with processing of the preprotein in heterologous recombinant cells.

Covalent modifications of inhibin, activin or prodomains are included within the scope hereof and include covalent or aggregative conjugates with other chemical moieties. Covalent derivatives are prepared by linkage of functionalities to groups which are found in the inhibin amino acid side chains or at the N-or C-termini, by means known in the art. For example, these derivatives will include: aliphatic esters or amides of the carboxyl terminus or residues containing carboxyl side chains, e.g., aspartyl residues; O-acyl derivatives of hydroxyl group-containing residues such as seryl or alanyl; and N-acyl derivatives of the amino terminal amino acid or amino-group containing residues, e.g. lysine or arginine. The acyl group is selected from the group of alkyl-moieties (including C3 to C10 normal alkyl), thereby forming alkanoyl species, and carbocyclic or heterocyclic compounds, thereby forming aroyl species. The reactive groups preferably are difunctional compounds known per se for use in cross-linking proteins to insoluble matrices through reactive side groups, e.g. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester. Preferred derivatization sites are at histidine residues.

Covalent or aggregative derivatives of mature inhibin, activin or prodomain sequences are useful as reagents in immunoassay or for affinity purification procedures. For example, inhibin or prodomain is insolubilized by covalent bonding to cyanogen bromide-activated Sepharose® by methods known per se or adsorbed to polyolefin surfaces (with or without glutaraldehyde cross-linking) for use in the assay or purification of anti-inhibin or anti-prodomain antibodies or cell surface receptors. Inhibin or a prodomain sequence also is labelled with a detectable group, e.g., radioiodinated by the chloramine T procedure, covalently bound to rare earth chelates or conjugated to another fluorescent moiety for use in diagnostic assays, especially for diagnosis of inhibin or prodomain levels in biological samples by competitive-type immunoassays.

DNA which encodes the complete  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin/activin is obtained by chemical synthesis, by screening reverse transcripts of mRNA from ovary, or by screening genomic libraries from any cell. It may be more efficient to simply synthesize portions of the DNA desired since screening is required to identify DNA to cDNA or genomic libraries that encode the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Synthesis also is advantageous because unique restriction sites can be introduced at the time of preparing the DNA, thereby facilitating the use of the gene in vectors containing restriction sites otherwise not present in the native sequence, and steps can be taken to enhance translational efficiency as discussed above, without the need to further modify the DNA as by mutagenesis or the like. cDNA encoding the  $\alpha$  or  $\beta$  chains is free of untranslated intervening sequences (introns) as well as free of flanking DNA encoding other proteins homologous to their source.

DNA encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  chains is obtained from other sources than porcine and human by (a) obtaining a cDNA library from the ovary of the target animal, (b) conducting Southern analysis with labelled DNA encoding porcine or human  $\alpha$  and  $\beta$  chains or fragments thereof (generally, greater than 100 bp) in order to detect clones in the cDNA library that contain homologous sequences, (c) analyzing the clones by restricting enzyme analysis and nucleic acid sequencing so as to identify full-length clones and, if full length clones are not present in the library, recovering appropriate fragments from the various clones and ligating them at restriction sites common to the clones to assemble a clone encoding the full-length molecule. As shown infra, any sequences missing from the library can be obtained by the 3' extension on ovarian mRNA of synthetic oligodeoxynucleotides complementary to cDNA identified by screening the library, or homologous sequences are supplied from known animal cDNAs. This is particularly useful in constructing pre or prepro inhibin sequences to facilitate processing of preproinhibin to mature inhibin from the desired species.

Porcine and human ovarian cDNA libraries initially were probed for DNA encoding inhibin sequences using labelled oligonucleotides whose sequence was based on the partial amino acid sequence determined from analysis of purified porcine inhibin or, in the case of human cDNA, porcine cDNA probes. However, once having described cDNA encoding human and porcine inhibin and prodomains, one skilled in the art would realize that precisely hybridizing probes can be prepared from the described sequences in order to readily obtain the remainder of the desired human or porcine gene.

Nucleotide sequence analyses of identified porcine and human cDNA clones revealed the structures of the biosynthetic precursors of both forms of inhibin. Interestingly, the two inhibin chains are not derived from a single processed precursor. Instead, the two chains are translated from separate mRNAs and then assembled into the disulfide crosslinked two-chain molecule.

Figs. 1B and 2B and 6, 8 and 9 depict the DNA encoding the polypeptide chains constituting porcine and human preproinhibin and preproactivin. Obviously, degenerate codons may be substituted for those disclosed in these figures where the same amino acid is encoded. The DNA of Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9 is mutated in order to encode the amino acid variants of the  $\alpha$  and  $\beta$ chains described above. In particular, the

prepro sequences are deleted and a start codon inserted immediately 5' to the mature chain in question so that the chain is expressed directly in recombinant culture. The DNA also is labelled, e.g. with radioactive phosphorous, and used to screen ovarian cDNA libraries from other species to identify  $\alpha$  or  $\beta$  chain encoding DNA from such other species as is generally described above.

Covalent labelling of this DNA is accomplished with a detectable substance such as fluorescent group, a radioactive atom or a chemiluminescent group by methods known per se. The labelled DNA is then used in conventional hybridization assays. Such assays are employed in identifying vectors and transformants as described in examples infra, or for in vitro diagnosis such as detection of mRNA in tissues.

Lengthy sequences desirably are synthesized in host cells transformed with vectors containing DNA encoding them, e.g. inhibin or prodomain sequence. Vectors are used to amplify the DNA which encodes the chains, either in order to prepare quantities of DNA for further processing (cloning vectors) or for expression of the chains (expression vectors). An expression vector is a replicable DNA construct in which a DNA sequence encoding an  $\alpha$  or  $\beta$  chain is operably linked to suitable control sequences capable of effecting their expression in a suitable host. Cloning vectors need not contain expression control sequences. Such control sequences include a transcriptional promoter, an optional operator sequence to control transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosomal binding sites (for prokaryotic expression), and sequences which control termination of transcription and translation. The vector should include a selection gene to facilitate the stable expression of the desired polypeptide and/or to identify transformants. However, the selection gene for maintaining  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain expression can be supplied by a separate vector in cotransformation systems using eukaryotic host cells.

Vectors comprise plasmids, viruses (including phage), and integratable DNA fragments i.e., fragments that are integratable into the host genome by recombination. The vectors described herein for use in eukaryotic cell expression of inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains contain plasmid sequences for cloning in microbes, where the plasmid replicates autonomously from the host genome, but the DNA is believed to integrate into the eukaryotic host cell genome upon transformation. Similarly, bacillus vectors that genomically integrate by homologous recombination in bacillus also are useful. However, all other forms of vectors which serve an equivalent function and which are, or become, known in the art are suitable for use herein.

Suitable vectors generally will contain replicon (origins of replication, for use in non-integrative vectors) and control sequences which are derived from species compatible with the intended expression host. Transformed host cells are cells which have been transformed or transfected with vectors containing inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain encoding DNA. Transformed host cells contain cloned DNA and, when transformed with an expression vector, also express the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. The expressed polypeptides will be deposited intracellularly or secreted into either the periplasmic space or the culture supernatant, depending upon the host cell selected and the presence of suitable processing signals in the expressed protein, e.g. homologous or heterologous signal sequences.

DNA regions are operably linked when they are functionally related to each other. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operably linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. Generally, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous and, in the case of secretory leaders, contiguous and in reading phase.

Suitable host cells are prokaryotes, yeast or higher eukaryotic cells. Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example <u>E. coli</u> or Bacilli. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. A preferred host cell is <u>E. coli</u> 294 (ATCC 31,446) although other prokaryotes such as <u>E. coli</u> B, <u>E. coli</u> X1776 (ATCC 31 537), <u>E. coli</u> W3110 (ATCC 27 325), pseudomonas species, or Serratia Marcesans are suitable.

Expression vectors for host cells ordinarily include an origin of replication (where extrachromosomal amplification is desired, as in cloning, the origin will be a bacterial origin), a promoter located upstream from the inhibin coding sequences, together with a ribosome binding side (the ribosome binding or Shine-Dalgarno sequence is only needed for prokaryotic expression), RNA splice site (if the inhibin DNA contains genomic DNA containing one or more introns), a polyadenylation site, and a transcriptional termination sequence. As noted, the skilled artisan will appreciate that certain of these sequences are not required for expression in certain hosts. An expression vector for use with microbes need only contain an origin of replication recognized by the intended host, a promoter which will function in the host and a phenotypic selection gene, for example, a gene encoding proteins conferring antibiotic resistance or supplying an auxotrophic requirement. Inhibin DNA is typically cloned in E. coli using pBR322, a plasmid derived from an E. coli species (Bolivar, et al., 1977 "Gene" 2: 95). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline

resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells.

Expression vectors, unlike cloning vectors, must contain a promoter which is recognized by the host organism. This is generally a promoter homologous to the intended host. Promoters most commonly used in recombinant DNA construction include the β-lactamase (penicillinase) and lactose promoter systems (Chang et al., 1978, "Nature", 275: 615; and Goeddel et al., 1979, "Nature" 281: 544), a tryptophan (trp) promoter system (Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057 and EPO Appl. Publ. No. 36,776) and the tac promoter [H. De Boer et al., 1983, "Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A." 80: 21-25]. While these are the most commonly used, other known microbial promoters are suitable. Details concerning their nucleotide sequences have been published, enabling a skilled worker operably to ligate them to DNA encoding inhibin in plasmid vectors (Siebenlist et al., 1980, "Cell" 20: 269) and the DNA encoding inhibin or its derivative. Promoters for use in prokaryotic expression systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the inhibin, i.e., the S.D. sequence is positioned so as to facilitate translation. Generally, this means that the promoter and S.D. sequences located upstream from the second codon of a bacterial structural gene are substituted for the sequences of prepro inhibin located 5' to the mature α and/or β chains.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as yeast cultures are transformed with inhibin-encoding vectors. Saccharomyces cerevisiae, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other strains are commonly available and useful herein. Yeast vectors generally will contain an origin of replication from the 2 micron yeast plasmid or an autonomously replicating sequence (ARS), a promoter, DNA encoding the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain, sequences for polyadenylation and transcription termination, and a selection gene. A suitable plasmid of expression in yeast is YRp7, (Stinchcomb et al., 1979, "Nature", 282: 39; Kingsman et al., 1979, "Gene", 7: 141; Tschemper et al., 1980, "Gene", 10:157). This plasmid already contains the trp1 gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, 1977, "Genetics", 85: 12). The presence of the trpl lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

Suitable promoting sequences in yeast vectors include the promoters for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., 1980, "J. Biol. Chem.", 255: 2073) or other glycolytic enzymes (Hess et al., 1968, "J. Adv. Enzyme Reg.", 7: 149; and Holland et al., 1978, "Biochemistry", 17, 4900), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylate, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression ar further described in R. Hitzeman et al., EP 73,657A.

Other yeast promoters, which have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the aforementioned metallothionein and glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, as well as enzymes responsible for maltose and galactose utilization. In constructing suitable expression plasmids, the termination sequences associated with these genes are also ligated into the expression vector 3' of the inhibin or derivative coding sequences to provide termination and polyadenylation of the mRNA.

Cultures of cells derived from multicellular organisms are the preferred host cells herein because it is believed that expression of hormonally active inhibin or activin will only occur in such cells, with microbial expression resulting at most only in immunological cross-reactivity. In principle, any higher eukaryotic cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. Propagation of vertebrate cells in culture per se has become a routine procedure in recent years [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)].

Suitable host cells for expressing  $\alpha$  or  $\beta$  chains in higher eukaryotes include: monkey kidney CVI line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CRL 10); chinese hamster ovary-cells-DHFR (described by Urlaub and Chasin, PNAS (USA) 77: 4216, [1980]); mouse sertoli cells (TM4, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23: 243-251 [1980]); monkey kidney cells (CVI ATCC CCL 70); african green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060652, ATCC CCL 51); rat hepatoma cells (HTC, M1, 54, Baumann, M., et al., J. Cell Biol. 85: 1-8 [1980]) and TRI cells (Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 [1982]).

The transcriptional and translation control sequences in vertebrate cell expression vectors preferably are provided from viral sources. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus

2, and most preferably Simian Virus 40 (SV40). The early and late promoters of SV40 are particularly useful because both are obtained easily from the virus as a fragment which also contains the SV40 viral origin of replication (Fiers et al., 1978, "Nature", 273: 113). Smaller or larger SV40 fragments may also be used, provided the approximately 250 bp sequence extending from the Hind III site toward the Bgl I site located in the viral origin of the replication is included. Further, it is also possible to utilize the genomic promoters, control and/or signal sequences normally associated with the  $\alpha$  or  $\beta$ -chains, provided each control sequences are compatible with and recognized by the host cell.

An origin of replication may be provided either by construction of the vector to include an exogenous origin, such as may be obtained from SV40 or other viral (e.g. Polyoma, Adenovirus, VSV, or BFV) source, or may be provided by the host cell chromosomal replication mechanism. If the vector is integrated into the host cell chromosome, the latter is often sufficient.

Rather than using vectors which contain viral origins of replication, mammalian cells are cotransformed with DNA encoding a selectable marker and DNA encoding the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. An example of a suitable selectable marker is dihydrofolate reductase (DHFR) or thymidine kinase. Such markers are proteins, generally enzymes that enable the identification of transformant cells, i.e., cells which had been competent to take up exogenous DNA. Generally, identification is by survival of transformants in culture medium that is toxic to untransformed cells or from which the cells cannot obtain a critical nutrient without having taken up the marker protein.

In selecting a preferred host mammalian cell for transfection by vectors which comprise DNA sequences encoding both inhibin and DHFR, it is appropriate to select the host according to the type of DHFR protein employed. If wild type DHFR protein is employed, it is preferable to select a host cell which is deficient in DHFR thus permitting the use of the DHFR coding sequence as marker for successful transfection in selective medium which lacks hypoxanthine, glycine, and thymidine (hgt<sup>-</sup>). An appropriate host cell in this case is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub and Chasin, 1980, "Proc., Nat'l. Acad. Sci." (USA) 77: 4216.

On the other hand, if DNA encoding DHFR protein with low binding affinity for methotrexate (MTX) is used as the controlling sequence, it is not necessary to use DHFR resistant cells. Because the mutant DHFR is resistant to MTX, MTX containing media can be used as a means of selection provided that the host cells are themselves MTX sensitive. Most eukaryotic cells which are capable of absorbing MTX appear to be methotrexate sensitive. One such useful cell line is a CHO line, CHO-KI (ATCC No. CCL 61). Preferably, transformants are first selected for neomycin resistance (the transfection is conducted together with DNA encoding the neomycin resistance gene), followed by MTX amplification of the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain expression as the case may be. See Kim et al., "Cell" 42: 129-138 (1985) and EP 160,457A.

Other methods suitable for adaptation to the synthesis of  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains in recombinant vertebrate cell culture are described in M-J. Gething et al., "Nature" 293: 620-625 (1981); N. Mantei et al., "Nature" 281: 40-46; and A. Levinson et al., EP 117,060A and 117,058A.

The inhibin  $\alpha$  chain is expressed in recombinant cell culture with or without either of the  $\beta$ -chain molecules. Similarly, host cells are transformed with DNA encoding either or both of the mature  $\beta$ -chains. Based on analogy to TGF- $\beta$ , the mature  $\beta$ -chains are capable of forming homodimers or  $\beta_A/\beta_B$  heterodimers upon expression in recombinant culture. These structures are not inhibin and will be referred to herein as  $\beta$ -chain dimers or activin. These are useful in the preparation of active inhibin, serving as sources of the  $\beta$ -chain, or are used as gel electrophoresis standards to detect the diversion into  $\beta$ -chain dimers of  $\beta$ -chains synthesized in  $\alpha$  and  $\beta$  chain cotransformants. As will be seen in Example 4, this is not a hypothetical problem. Of course, the dimers are also useful in modulating reproduction as noted above.

 $\beta$ -chain hetero or homodimers are separated by  $\underline{\text{in}}$   $\underline{\text{vitro}}$  unfolding of the individual chains followed by oxidative disulfide bond formation with the  $\alpha$ -chain  $\underline{\text{in}}$  accord with processes generally known  $\underline{\text{per}}$   $\underline{\text{se}}$ . Preferably, however, in preparing mature inhibin the recombinant host is transformed with DNA encoding both the  $\alpha$  and either of the  $\beta$ -chains. The intact hormonally active molecule is then assembled by the host  $\underline{\text{cell in}}$   $\underline{\text{vivo}}$ , and it is thus unnecessary to combing the two chains by  $\underline{\text{in}}$   $\underline{\text{vitro}}$  processing. The DNA encoding the  $\alpha$  and  $\beta$ -chains is preferably located on the same vector, and under the control of the same promoter, but this is not essential.

Certain  $\beta$ -chain amino acid sequence variants identified in the screening procedure will not bind to pituitary cell surface receptors nor as a consequence will they exhibit hormonal activity. Such variants, when expressed as homodimers in recombinant cell culture, are useful in immunoassays for activin when they bear immunological epitopes cross-reactive with the native  $\beta$ -chain. In addition, such variants are coexpressed with DNA encoding hormonally active  $\beta$ -chain to yield a hybrid bearing native and variant  $\beta$ -chain. In this case the variant serves to stabilize the structure of the native  $\beta$ -chain. This form of  $\beta$ -chain heterodimer is useful, like the homodimer, in immunoassays for activin. It may also function as an activin antagonist.

The activin/inhibin  $\beta$ -chains also are coexpressed with TGF- $\beta$  in order to produce  $\beta$ -chain/TGF- $\beta$  hybrids. Vectors and methods for the expression of TGF- $\beta$  are known. For example, see Derynck et al., Human Transforming Growth Factor- $\beta$  Complementary DNA Sequence and Expression in Normal and Transformed Cells "Nature" 316: 701-705 (1985). Contransformation of mammalian host cells by vectors bearing the TGF- $\beta$  gene as described by Derynck et al. together with the  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains of activin/inhibin will result in secretion of a proportion of a  $\beta$ -chain/TGF- $\beta$  hybrid dimers. This hybrid is useful in preparing TGF- $\beta/\beta$ -chain immunogens or in immunoassays.

Inhibin, activin or prodomain sequences are recovered from transformed cells in accord with per seknown procedures. When a polypeptide is expressed in recombinant bacteria as a refractile body, the desired polypeptide is recovered and refolded by conventional methods. Alternatively, the culture supernatants from transformed cells that secrete activin or inhibin, preferably mammalian cells, are simply separated from the cells by centrifugation. Then the inhibin generally is purified by successive purification procedures that include heparin-Sepharose affinity chromatography, gel filtration and at least one and preferably several RP-HPLC (reverse phase high pressure liquid chromatography) steps using different conditions in the stationary phase and/or mobile phase. Prodomain sequences produced by in vitro synthesis will be purified by conventional methods.

The prodomain polypeptides that are preferred for use herein are recovered from the culture media of recombinant cells transformed to synthesize the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains as appropriate for the desired prodomain. Specifically, they are recovered by separating the culture medium polypeptides on native electrophoresis gel, excising bands having the predicted molecular weight and thereafter purifying the eluted polypeptides further, for example by FPLC or HPLC, followed by amino acid sequence determination for the substantially homogeneous separated polypeptides. Purified prodomain polypeptides then are used to raise antibodies, e.g., in rabbits, which when used in immunoaffinity purification will simplify the recovery of the prodomains.

In the preferred procedure for isolating porcine hormonally active inhibin, clarified transformant culture supernatant or cell lysate is first purified by heparin-Sepharose® affinity chromatography, next by gel filtration on Sephacryl® S-200 gel and then with four successive RP-HPLCs using different mobile phase gradients and/or derivatized silica supports. Preferably, stationary phases having relatively low hydrophobicity are used, with C3-C8 columns being preferred and C3-C5 and phenyl columns being particularly preferred. Solute specificity of the mobile phase is preferably adjusted by varying the concentration of an organic component, particularly acetonitrile. Although a single RP-HPLC fractionation significantly increases the purity relative to the gel-filtrated material, two or more, and preferably four, RP-HPLC purifications are generally performed subsequent to successive treatment by heparin-Sepharose chromatography and gel filtration. This method has been found to be adaptable to the purification of human inhibin from recombinant cell culture as well.

The first step of the purification is heparin-Sepharose affinity chromatography, in which the protein is adsorbed to the Sepharose-bound heparin moieties under application conditions, and the adsorbed inhibin material is recovered by 1M NaCl elution. This step greatly expedites the purification procedure for crude extracts because it allows a relatively large volume of a crude extract to be processed fairly rapidly while recovering an amount of protein exhibiting total inhibin activity equal to at least 90% of that of the crude extract.

For the detection of inhibin activity in the various column fractions, aliquots ranging from 0.01% to 0.1% by volume are removed, and after added 100  $\mu$ g human serum albumin in 100  $\mu$ l water, the solvents were evaporated in a Speed-Vac concentrator (Savant, Hicksville, N.Y.). The residue as redissolved in 3 ml 1% fetal bovine serum in HDMEM, filtered through a Millex-GS 0.22  $\mu$ m filter (Millipore Corp., Bedford, MA) and assayed in duplicate. To speed up the bioassays during the purification process, only basal inhibition of FSH secretion exerted by the inhibin activity is determined and plotted in the region where the inhibin proteins were expected to migrate in the chromatograms.

To perform the heparin-Sepharose affinity chromatography, cell debris is spun down in a Beckman J2-21 centrifuge (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA.) using a JA-20 rotor at 10,000 rpm for 30 minutes. One half of the supernatant is diluted in 10 times its volume by the addition of 0.01 M Tris-HCl containing 0.1 M NaCl, pH 7, in an Erlenmeyer flask and pumped simultaneously via silastic tubes (0.76 mm ID) into heparin-Sepharose® (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.) columns (3.5 x 9 cm) by two Rabbit 4-channel peristaltic pumps (Rainin Instrument Co., Inc., Emeryville, CA) at 40 ml/hr per column. After all the fluid has been pumped through the heparin-Sepharose, the eight columns are washed simultaneously with 0.01 M Tris-HCl, pH 7, containing 0.1 M NaCl in the same manner. The adsorbed proteins with inhibin activity are removed by washing the eight columns simultaneously with 0.01 M Tris-HCl containing 1 M NaCl, pH 7, as above, and the wash is collected into fractions. The inhibin activity is monitored by the in

vitro bioassay described above. The columns are regenerated by further washing with 2M NaCl in 0.01 M Tris-HCl, pH 7, and re-equilibrated with 0.01 M Tris-HCl containing 0.1 M NaCl for purification of remaining extract.

Next, the material is fractionated by gel filtration to separate proteins generally according to their molecular weights. The fractions having inhibin activity extracted by the heparin-Sepharose columns were pooled and dialyzed overnight to remove NaCl in a 28.6 mm cylinder diameter Spectrapor No. 3 membrane tubing with Mr cutoff at 3,500 (Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, CA.) against 30% acetic acid. The retained fluid is centrifuged, as above, to remove a white precipitate, and the supernatant is divided into equal portions for applying to 5 x 100 cm Sephacryl S-200 superfine columns (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.). Each column is eluted with 30% acetic acid at 20 ml for 22 min., and the column fractions are monitored by UV absorption at 280 nm and by bioassay.

The bioassay-positive protein from the S-200 columns is pooled and lyophilized. The lyophilized material is dissolved in 0.2N acetic acid (1 ml/ml) and filtered through a Millex-HA 0.45 µm filter (Millipore Corp., Bedford, MA.). The filtrate is applied directly onto a 1 x 25 cm Vydac 5-µm particle-size C4 column (The Separations Group Hesperia, CA.) and developed with a gradient of TEAP buffer. In the TEAP system, buffer A consists of 0.25 N triethylammonium phosphate pH 3, and buffer B is 80% acetonitrile in buffer A. After all the filtrate had been loaded, the column is washed with the aqueous buffer A until the UV absorption reached baseline. The fractions exhibiting inhibin activity are separated in a Beckman 332 gradient liquid chromatography system (Beckman Instruments, Inc., Berkeley, CA.) equipped with a Spectroflow 757 UV detector (Kratos Analytical Instruments, Ramsey, N.J.), a Soltec 220 recorder (Soltec Corp., Sun Valley, CA.) and a Redirac 2112 fraction collector (LKB Instruments, Inc., Gathersburg, MD). Zones of inhibin activity are detected by bioassay.

Inhibin protein containing the  $\beta_B$  chain is further purified free of inhibin containing the  $\beta_A$  species, if desired, by two more RP-HPLC steps. The first step uses a 1 x 25 cm Vydac 5- $\mu$ m-particle-size C4 column and a trifluoroacetic acid (TFA) buffer system and the second step employs a 1 x 25 cm Vydac 5- $\mu$ m-particle-size Phenyl column and the TEAP buffer system. In the TFA system, buffer A contains 1 ml trifluoroacetic acid in 999 ml water and buffer B is 1 ml trifluoroacetic acid in 199 ml water and 800 ml acetonitrile. The two inhibin species elute separately. Inhibin accumulated from a few batches was concentrated by RP-HPLC using a 0.46 x 25 cm Aquapore RF-300 10  $\mu$ m-particle-size column (Brownlee Labs., Santa Clara, CA.) and the TFA buffer system. Ordinarily, however, this purification step will not be used with cell culture supernatants from transformants with DNA encoding only the  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains.

Inhibin, activin, prodomain sequences or their variants are administered in the form of pharmaceutically acceptable nontoxic salts, such as acid addition salts or metal complexes e.g., with zinc, iron or the like (which are considered as salts for purposes of this application). Illustrative of such acid addition salts are hydrochloride, hydrobromide, sulphate, phosphate, maleate, acetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate and the like. Intravenous administration in isotonic saline, phosphate buffer solutions or the like is suitable.

The polypeptide herein should be administered under the guidance of a physician, and pharmaceutical compositions will usually contain an effective amount of the peptide in conjunction with a conventional, pharmaceutically-acceptable carrier. The dosage will vary depending upon the specific purpose for which the protein is being administered, and dosage levels in the range of about 0.1 to about 1 milligram per Kg. of body weight may be used when inhibin is administered on a regular basis as a male contraceptive.

Inhibin, activin, prodomain sequences or their variants desirably are administered from an implantable or skin-adhesive sustained-release article. Examples of suitable systems include copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (U. Sidman et al., 1983, "Biopolymers" 22(1): 547-556), poly (2-hydroxyethyl-methacrylate) (R. Langer et al., 1981, "J. Biomed. Mater. Res." 15: 167-277 and R. Langer, 1982, "Chem. Tech." 12: 98-105) ethylene vinyl acetate (R. Langer et al., Id.), or poly-D-(-)-3- Hydroxybutyric acid (EP 133,988A). Such articles are implanted subcutaneously or are placed into contact with the skin or mucous membranes.

In order to simplify the Examples certain frequently occurring methods will be referenced by shorthand phrases.

Plasmids are designated by a low case p preceded and/or followed by capital letters and/or numbers. The starting plasmids herein are commercially available, are publicly available on an unrestricted basis, or can be constructed from publicly available plasmids or DNA in accord with published procedures. In addition, other equivalent plasmids are known in the art and will be apparent to the ordinary artisan.

"Digestion" of DNA refers to catalytic cleavage of the DNA with an enzyme that acts only at certain locations in the DNA. Such enzymes are called restriction enzymes, and the sites for which each is specific is called a restriction site. "Partial" digestion refers to incomplete digestion by a restriction enzyme, i.e,

conditions are chosen that result in cleavage of some but not all of the sites for a given restriction endonuclease in a DNA substrate. The various restriction enzymes used herein are commercially available and their reaction conditions, cofactors and other requirements as established by the enzyme suppliers were used. Restriction enzymes commonly are designed by abbreviations composed of a capital letter followed by other letters and then, generally, a number representing the microorganism from which each restriction enzyme originally was obtained. In generally, about 1 µg of plasmid or DNA fragment is used with about 1 unit of enzyme in about 20 µI of buffer solution. Appropriate buffers and substrate amounts for particular restriction enzymes are specified by the manufacturer. Incubation times of about 1 hour at 37°C are ordinarily used, but may vary in accordance with the supplier's instructions. After incubation, protein is removed by extraction with phenol and chloroform, and the digested nucleic acid is recovered from the aqueous fraction by precipitation with ethanol. Digestion with a restriction enzyme infrequently is followed with bacterial alkaline phosphatase hydrolysis of the terminal 5' phosphates to prevent the two restriction cleaved ends of a DNA fragment from "circularizing" or forming a closed loop that would impede insertion of another DNA fragment at the restriction site. Unless otherwise stated, digestion of plasmids is not followed by 5' terminal dephosphorylation. Procedures and reagents for dephosphorylation are conventional (T. Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning pp. 133-134).

"Recovery" or "isolation" of a given fragment of DNA from a restriction digest means separation of the digest on polyacrylamide gel electrophoresis, identification of the fragment of interest by comparison of its mobility versus that of market DNA fragments of known molecular weight, removal of the gel section containing the desired fragment, and separation of the gel from DNA. This procedure is known generally. For example, see R. Lawn et al., 1981, "Nucleic Acids Res." 9: 6103-6114, and D. Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057.

"Southern Analysis" is a method by which the presence of DNA sequences in a digest or DNA-containing composition is confirmed by hybridization to a known, labelled oligonucleotide or DNA fragment. For the purposes herein, unless otherwise provided, Southern analysis shall mean separation of digests on 1 percent agarose, denaturation and transfer to nitrocellulose by the method of E. Southern, 1975, "J. Mol. Biol." 98: 503-517, and hybridization as described by T. Maniatis et al., 1978, "Cell" 15: 687-701.

"Transformation" means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or chromosomal integrant. Unless otherwise provided, the method used herein for transformation of <u>E. coli</u> is the CaCl<sub>2</sub> method of Mandel et al., 1970, "J. Mol. Biol." 53: 154.

"Ligation" refers to the process of forming phosphodiester bonds between two double stranded nucleic acid fragments (T. Maniatis et al., Id., p. 146). Unless otherwise provided, ligation may be accomplished using known buffers and conditions with 10 units of T4 DNA ligase ("ligase") per 0.5 µg of approximately equimolar amounts of the DNA fragments to be ligated.

"Preparation" of DNA from transformants means isolating plasmid DNA from microbial culture. Unless otherwise provided, the alkaline/SDS method of Maniatis et al., Id. p. 90., may be used.

"Oligonucleotides" are short length single or double stranded polydeoxynucleotides which are chemically synthesized by known methods and then purified on polyacrylamide gels.

### EXAMPLE 1

### Isolation of Cloned Inhibin a-Subunit cDNAs

The strategy for identification of clones containing coding sequences for the porcine inhibin subunits was based on the "long-probe" approach, successful in some previous instances (Anderson et al., 1983, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 80:6836-6842 and Ullrich et al., 1984, "Nature" 309:418-425). Briefly, a high-complexity cDNA library constructed in  $\lambda$ gt10 and derived from porcine ovarian mRNA by oligo-dT-primed cDNA synthesis was screened with a single 64-base-long synthetic oligodeoxynucleotide directed against the N-terminal amino acid sequence of the  $\alpha$ -chain of porcine inhibin. It was found that the library is to be prepared from fresh ovarian tissue because the inhibin chain mRNA was apparently quite labile. Approximately 1 in 2,000 plaques hybridized with this probe, and sequence analysis of several hybridizing cloned cDNAs confirmed correct probe identification. This analysis revealed that none of the characterized cDNAs contained sufficient sequence information to predict the complete structure of the  $\alpha$ -chain precursor protein. Rather than analyzing more clones from the same cDNA library, a second library was constructed by 3' extension on ovarian mRNA of a synthetic oligodeoxynucleotide complementary to a sequenced region encoding  $\alpha$  precursor residues 60-64 (Fig. 1A). This library was screened with a suitable restriction fragment from a previously analyzed cDNA and yielded several isolates which specified the remainder of the DNA sequences encoding the N-terminal region of the  $\alpha$  precursor. Completeness of the coding sequence was

judged from the presence of a long reading frame which specifies the porcine  $\alpha$ -chain peptide sequence and starts with a methionine codon preceded by an in-frame stop codon and followed by a hydrophobic sequence bearing the hallmarks of a signal peptide. The full sequences for the precursor protein and its cDNA are shown in Fig. 1B. The complete protein including signal peptide has an Mr of ~40K consisting of 364 amino acids, of which the C-terminal 134 (Mr, ~14.5K) constitute the porcine inhibin  $\alpha$ -chain. There are several Arg-Arg sequences in the proregion of the precursor, one of them directly preceding the  $\alpha$  subunit. We believe that this latter pair of basic residues is the processing site for the proteolytic release of the  $\alpha$  peptide. The deduced precursor sequence predicts two N-linked glycosylation sites, one within the  $\alpha$  chain proper.

In addition to the coding region, the cDNA sequence contains a 3'-untranslated sequence of 167 nucleotides, including the canonical AATAAA polyadenylation signal, and a 5'-untranslated region, the proper length of which is presently unknown.

The detailed method was as follows:

10

20

25

45

55

Polyadenylated mRNA was prepared from freshly frozen porcine ovaries (Kaplan et al., "J. Biochem." 183: 181-184) An oligo-dT-primed cDNA library of ~6x10<sup>6</sup> clones in λgt10 (Huynh et al., 1984, DNA Cloning Techniques., Ed. D. Clover) was prepared form 5 μg polyA+ mRNA as described by Wood et al., "Nature" 312: 330-337 (1984), except that the EcoRI adaptors used had the sequence

# 5'-AATTCACTCGAGACGC-3' 3'-GTGAGCTCTGCG-5'P.

Approximately 1 x 10<sup>6</sup> unamplified cDNA clones were screened with 5 a-subunit oligonucleotide

# S'-ACCGCCCCTTTGCCTTGGCCTTGGTCCCCTGCTGCTGAGACTGCTGCAGAGACCTCCTGAGG-3',

based on the amino acid sequence underlined in Fig. 1B. Hybridization was carried out with the phosphorylated <sup>32</sup>P-labelled probe in 5xSSC, 40% formamide at 37 °C. Filters were washed at 50 °C with 1xSSC, 0.1% SDS. Approximately 500 hybridization positive clones were obtained, twelve of which were purified and examined for insert size. The EcoR1 inserts of five of these (λPIN-α2, -α5A, -α5, -α9, -α10) were subcloned into M13 derivatives (Messing et al., 1981 "Nucl. Acids Res." 9:309-321) and sequenced by the dideoxy chain termination method of Sanger et al., "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 74:5463-5467 (1977). A specifically primed library was prepared by priming 5 μg of polyA mRNA with the oligonucleotide 5'-CCCCACAGCATGTCTT-3' (complementary to nucleotides 248-263) and subsequent cloning into λgt10. Approximately 2x10<sup>5</sup> clones of the 1x10<sup>6</sup> clones obtained were screened with the 5' 100bp EcoRI-BamHI fragment prepared from λPIN-α2. Twelve of the 170 hybridization positive clones obtained were purified and two (λPIN-S12s, -S4s) were sequenced by the dideoxy method. The complete nucleotide sequences of the α-subunit cDNAs were obtained by subcloning various restriction fragments with the different λ isolates into the M13 phage derivatives. Compressions were resolved by the use of deoxyinosine mixes in combination with the E. coli single stranded binding protein (Pharmacia).

### Isolation of Cloned Inhibin & Subunit cDNAS

The cDNA sequences encoding the precursors of the inhibin  $\beta$  subunits were obtained from the same cDNA libraries used for the  $\alpha$  subunit. Overlapping cDNA clones were isolated by screening first with single long synthetic oligodeoxynucleotide probes based on the two N-terminal  $\beta$  subunit sequences and subsequently with suitable restriction fragments derived from characterized cDNA clones which served as probes for "walking" in both 5' and 3' directions (Fig. 2A).

In more detail, approximately  $2x10^5$  oligo-dT primed ovarian cDNA clones were screened with the 5' end labelled  $\beta_A$  oligonucleotide,

# 5'-AAGAAGCAGTTCTTTGTGTCCTTCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGGATCATTGC-3'

based on the amino acid sequence of residues 321-339. Five hybridization positives were obtained, of which three proved to contain  $\beta_A$  coding sequences ( $\lambda$ PIN- $\beta$ A2, - $\beta_A$ 4, - $\beta_A$ 8). A 5' end 154 bp EcoRI-HindIII

(nucleotides 158-297) fragment and a 3' end 213 bp  $\underline{\text{Eco}}$ RI-Pst fragment (nucleotides 1679-1892) derived from  $\lambda PIN\beta A2$  were used to screen  $2x10^6$  oligo-dT primed cDNA clones and  $2x10^5$  clones from the  $\alpha$ -chain specifically primed library. Out of the sixteen clones analyzed in detail two were found to have longer 5' ends ( $\lambda PIN-\beta_A5s$ ,  $-\beta_A22$ ) and one clone  $\lambda PIN-\beta_A21$  contained the entire 3'-untranslated region. Porcine inhibin  $\beta_B$  subunit cDNA clones were isolated by screening  $2x10^5$  clones from the specifically primed library with the  $\beta_B$  oligonucleotide

# 5'-GGCCTGGAGTGTGATGGGAGAACCAACCTGTCCTGCCGCCAGGAATTTTTCATCGATTTCAGGCT-3'

which was based on the  $NH_2$ -terminal sequence described in Fig. 1A. Positive clones were further screened with the oligonucleotide inosine probe 5'-AAITCTATIAAIAA $_c^T$  TG $_c^T$  -3' ("I" in this sequence stands for inosine), which covers all the possibilities in the non-coding strand for the amino acid sequence QQFFIDF. Two clones ( $\lambda$ PIN $\beta_B$ -1s, -2s) were isolated and sequenced and found to code for the  $\beta_B$  subunit. A 230 bp EcoRI-Sma (nucleotides 21-251) fragment was isolated from  $\lambda$ PIN $\beta_B$ -I and used as a hybridization probe to screen  $2x10^5$  oligo-dT primed cDNA clones. Two positives were obtained ( $\lambda$ PIN $\beta_B$ -3,4). The nucleotide sequence of these overlapping clones was used to construct the sequence shown. All sequences were obtained by subcloning specific fragments into M13 phage vectors (Messing et al., op cit.). The EcoRI restriction sites referred to above are all contained within the cDNA adaptor fragment, and do not refer to sequences present in the cDNA.

We noted that only very few clones from the oligo-dT-primed library (4 out of  $2x10^5$ ) hybridized with the synthetic probe for the  $\beta$ -subunit of inhibin A. Although most of these proved correct by DNA sequence analysis, none contained a full 3'-untranslated region, as judged by the absence of a polyA homopolymer at their 3' ends. Absence of polyA tails suggested the existence of a very long 3'-untranslated sequence in this mRNA species and/or structural region(s) which prove difficult to copy by the polymerases used for library construction. Unexpectedly, a higher abundance (~10-fold) of inhibin  $\beta_A$  subunit coding sequences was found in the cDNA library made by specific priming on  $\alpha$ -subunit mRNA. This library was screened with the synthetic probe for the  $\beta$ -chain of inhibin A on the subsequently refuted theory that the  $\alpha$  precursor mRNA might also encode the  $\beta$  subunit. The high abundance of inhibin  $\beta_A$  cDNA in this library was later traced to fortuitous complementarity of the specific  $\alpha$  chain primer to a region in the 3'-untranslated portion of the corresponding mRNA.

Only four cloned cDNAs encoding the  $\beta$  subunit of inhibin B were found in our libraries. The sequence information obtained from these clones failed to reveal the complete structure of the corresponding precursor protein and its cDNA. The sequences of cDNAs and deduced protein structures for the precursors of the  $\beta$  subunits are compared in Fig. 2B. The nucleotide sequence of inhibin  $\beta_A$  subunit cDNA is 3.6 kb in length and contains an open reading frame for a protein of 425 amino acids (Mr ~46K), the C-terminal 116 residues of which represent the  $\beta$  subunit proper (Mr ~13K). This reading frame begins with a methionine codon followed by a sequence that codes for a characteristic signal peptide, the true length of which is believed to be 29 residues. The encoded  $\beta$  subunit is preceded by a string of 5 arginines at which it is presumably proteolytically cleaved from the precursor. Similar to the  $\alpha$  subunit precursor, this  $\beta$  precursor contains several additional pairs of basic residues at which hitherto unknown biologically active peptide entities are believed to be released. It also contains one possible site of N-linked glycosylation in the proregion (Asn, residue 165).

The deduced protein sequence for the  $\beta$  subunit of inhibin B shows high homology with the  $\beta_A$  subunit sequence. 71 amino acid residues are identical and most changes are conservative in nature. Sequence homology, although of a lesser degree, is also found in the proregion of both  $\beta$  subunit precursors. Interestingly, an extremely purine-rich sequence rarely seen in coding regions but present in the cDNA encoding the inhibin  $\beta_A$  precursor and resulting in a curious amino acid sequence is not found in the cDNA which codes for the homologous  $\beta_B$  precursor. This results in a gap of 22 amino acid residues from the  $\beta_B$  precursor of inhibin when protein sequences are aligned for maximal homology. Such alignment also brings about a perfect match in the cysteine positions of both precursors (see Fig. 2B).

### Northern Analysis of $\alpha$ and $\beta$ chain Precursor mRNAS

10

Ovarian total and polyadenylated RNAs were analyzed by the Northern procedure using the sequenced cDNAs as probes to assess size and relative abundance of the mRNAs which encode the peptide subunits  $\alpha$  and  $\beta$  and  $\beta_B$  of the heterodimeric inhibin molecule. Polyadenylated mRNA (2  $\mu$ g: lanes a, b, c, and f; 8  $\mu$ g: lane d) and total RNA (10  $\mu$ g: lanes e and g) were electrophoresed into a formaldehyde 1.2% agarose

gel and blotted onto nitro-cellulose filters. The following  $^{32}$ P-labelled cDNA fragments were used as hybridization probes under stringent conditions. Lane a: 240 bp <u>EcoRI-Smal</u> (nucleotides 134-371) from  $\alpha$  subunit cDNA; b: 154 pb <u>EcoRI-HindIII</u> (nucleotides 158-297) from  $\beta$ A subunit cDNA; c: 230 bp <u>EcoRI-Smal</u> (nucleotides 21-251) from  $\beta$ B subunit cDNA; d and e: <u>EcoRI insert of  $\lambda$ PIN- $\alpha$ 2; f and g: <u>EcoRI insert of  $\lambda$ PIN- $\beta$ A5. Filters were washed for 2 hours with 3 changes of 0.1xSSC, 0.1% SDS at 60 ° C.</u></u>

Analysis showed (Fig. 3) that  $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs are of different size and abundance, as indicated by results obtained from cDNA cloning. From their respective band intensities the  $\alpha$  precursor mRNA is estimated to be at least of 10-fold higher abundance than the mRNA for the  $\beta_A$  precursor, and approximately 20-fold higher than the mRNA for the  $\beta_B$  precursor.

Using ribosomal RNAs as size standards, the  $\alpha$  precursor mRNA, which is a single species, is ~1500 nucleotides in length, a size in good agreement with the cloned cDNA sequence (Fig. 1B).  $\beta_A$  precursor mRNA sequences are represented by two main species of ~4.5 and ~7.2 kb in length. The relatively higher intensity of both species in polyadenylated than total RNA suggests that the 4.5 kb species does not represent 28S RNA which hybridized to the cDNA probe. Thus, the  $\beta$  precursor cDNA sequences shown in Fig. 2B are thought to represent the 4.5 kb mRNA, suggesting that the 5' untranslated region for the  $\beta_A$  mRNA is approximately 900 nucleotides long. The  $\beta_B$  precursor is encoded on one mRNA, of approximately 4.5 kb in size, which is present at roughly half the level of the two  $\beta_A$  mRNAs. Since the two  $\beta$  mRNAs are closely related, one can predict that both mRNAs have a similar structure and thus the  $\beta_B$  mRNA presumably possesses a long 5' and 3' untranslated region equivalent to that shown for the  $\beta_A$  mRNA. Choice of a different polyadenylation signal might explain the existence of the 7.2 kb species.

### Homology To Transforming Growth Factor-β

The mature  $\alpha$  and  $\beta$  inhibin subunits contain seven and nine cysteine residues respectively. Upon alignment of the cysteine residues it is apparent that the two subunits share a similar cysteine distribution and some sequence homology exists around these residues (Fig. 4), suggesting that both types of subunits derive from one ancestral gene. Surprisingly, significant homology was found between the  $\beta$  chain and the primary structure of human TGF- $\beta$  recently determined. As outlined in Fig. 4, both peptides are of nearly equal length (inhibin  $\beta_A$  subunit, 116,  $\beta_B$  subunit 115; TGFS, 116 residues) and show a strikingly similar distribution of their nine cysteine residues. Using this cysteine "skeleton" for alignment, the  $\beta_A$  and TGF- $\beta$  sequences have an additional 31 residues in identical positions and show conservative changes in nine homologous places. Similar high homologies are seen upon comparison of the  $\beta_B$  and  $\beta$ -TGF. Some gaps were introduced for better alignment (Fig. 4). The overall homology reaches 35%, but approaches 60% in certain sections (cf. porcine inhibin  $\beta_A$  chain residues 11-45 and TGF residues 15-49), a very high degree of homology considering the difference in species. Interestingly, this homology extends beyond the termination codon for protein synthesis in the respective cDNAs. Thus, the cDNAs for TGF- $\beta$  and both inhibin  $\beta$  subunits contain a highly G and C rich sequence in this region, and they also possess unusually long 5' and 3' untranslated regions.

One can discount the suggestion that the  $\beta$  subunit of inhibin is the porcine equivalent of human TGF- $\beta$ , since there is almost absolute homology between human and murine  $\beta$ -TGFs. These findings strongly indicate that both inhibin subunits and TGF- $\beta$  have a common ancestor and belong to one gene family. All three peptides are derived from similarly-sized precursors ( $M_r$  ~40K) where they occupy the C-terminal 110 or so residues and are released by proteolytic cleavage at pairs of arginines. They form homoor heterodimers, and subunits in the biologically active complex are linked by disulfide bridges. However, there is little sequence homology between TGF- $\beta$  and the  $\beta$  subunits in the pro parts of their precursors, although the regions comprising the odd residues which precede the  $\beta$  subunit and TGF peptides display limited but significant sequence relatedness.

### **EXAMPLE 2**

50

## Recombinant Synthesis of Porcine Inhibin

The plasmid used for recombinant synthesis of porcine inhibin was pSVE-PαB<sub>A</sub>Inh-DHFR. The procedure to construct this plasmid is shown in Fig. 5. This plasmid was constructed as follows:

pHBS348-E (EP 0073656A) was partially digested with EcoRI, blunted with E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) and the four dNTPs, ligated and the ligation mixture was transformed into E. coli 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmids were screened for the loss of the EcoRI site preceding the SV40 early promoter. A

plasmid having the site deleted is referred to as pHBS348-EII.

30

pHBS348-EII was digested with EcoRI and EcoRI to produce two fragments, fragment I containing the SV40 early promoter, pmL-Amp' sequences and the HBsAg 3' untranslated region and fragment 2 containing the HBsAg (hepatitis B antigen) coding sequences.

 $\lambda PIN\beta_A S_S$  containing the coding region for the porcine inhibin  $\beta_A$  subunit was digested with EcoRI and Smal and the 1335 bp fragment (fragment 3) containing the  $\beta_A$  coding region recovered by polyacrylamide gel electrophoresis. Fragment I, recovered by agarose gel electrophoresis, was ligated to fragment 3 and the ligation mixture transformed into E. coli strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmid DNA was prepared from transformants and checked by restriction analysis for the presence of the correct DNA fragments. This plasmid is referred to as pSVE-p $\beta_A$ Inh.

pHBS348-E (EP 0073656A) was partially digested with <u>EcoRI</u>, blunted with <u>E. coli</u> DNA polymerase I (Klenow fragment) and the four dNTPs, ligated to the synthetic oligonucleotide 5' GGTCGACC-3' containing the <u>Sall</u> recognition site. The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmids were screened for the presence of the extra <u>Sall</u> restriction site. Plasmid DNA is prepared from this construction (pHBS348-ESall).

 $\lambda$ PIN $\alpha$ -12s and  $\lambda$ PIN $\alpha$ -2 were digested with <u>EcoRI</u> and <u>BamHI</u>. A 104 <u>bpEcoRI-BamHI</u> fragment from  $\lambda$ PIN $\alpha$ -12s containing the 5' coding region and a 1246 <u>bp EcoRI-BamHI</u> fragment from  $\lambda$ PIN $\alpha$ -2 containing the middle and 3' coding region were recovered and ligated together. The ligation mixture was digested with <u>EcoRI</u>, the enzyme heat denatured, and the mixture ligated to <u>EcoRI-digested pUC9</u> (BRL). Recombinants were selected and confirmed by restriction analysis. DNA was prepared from the correct plasmid (pPIN $\alpha$ ).

pPINα, containing the complete coding region for porcine α-inhibin was digested with Ncol and EcoRI, filled in by Pol(I)K in the presence of 4dNTP's, the 1280 bp fragment (fragment 4) was recovered by gel electrophoresis. pHBS348-ESaII was digested with SstII and HindIII, filled in by Pol(I)K in the presence of 4dNTP's, and fragment 5 containing the PML-Amp' region, SV40 early promoter and HBsAg 3' untranslated region was recovered by gel electrophoresis. Fragments 4 and 5 were ligated together and the ligation mixture used to transform E. coli 294 (ATCC 31446). Recombinants were selected by growing on Ampicillin media plates. The desired recombinant is called pSVE-PαInh.

pHBS348-ESall was digested with Sall and HindIII and fragment 6 containing the pML-Amp', and SV40 early promoter was recovered by gel electrophoresis. pFD II (EP 117,060A) was digested with Sall and HindIII and fragment 7 was recovered which contains the normal mouse DHFR gene fused to the HBsAg 3' untranslated region. Fragments 6 and 7 were ligated, and the ligation mixture transformed into E. coli strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmid DNA was prepared from transformants and checked by restriction analysis for the presence of the correct DNA fragments. This construction is referred to as pFDII-Sal1.

pSVE- $P\alpha$ Inh was digested with <u>Sall</u> and fragment 8 was recovered which contains the SV40 early promoter and the  $\alpha$ -inhibin coding region fused to the HBsAg 3'-untranslated region. pFDII-Sall was digested with Sall and fragment 9 containing the SV40 early promoter and the mouse DHFR coding region linked to the HBsAg 3'-untranslated region was recovered. pSVE- $\beta_A$ Inh was linearized by <u>Sall</u> digestion and ligated to fragments 8 and 9 in a three part ligation. The ligation mixture was transformed into <u>E. coli</u> strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture is plated on ampcillin media plates and resistant colonies selected. Transformants were screened for the presence of fragments 8 and 9 in the correct orientation such that transcription from the three SV40 early promoters will proceed in the same direction. This final plasmid is designated pSVE- $P\alpha\beta_A$ Inh-DHFR.

Plasmid pSVE- $P\alpha\beta_A$ Inh-DHFR was transfected into DHFR deficient CHO cells (Urlaub and Chasin, 1980, PNAS 77,4216-4220). However, any DHFR<sup>-</sup> mammalian host cell is suitable for use with this plasmid. Alternatively, any mammalian host cell is useful when the host cell is cotransformed with a plasmid encoding neomycin resistance, and transformants identified by their ability to grow in neomycin-containing medium.

The transfected CHO cells were selected by culturing in 15 HGT<sup>-</sup> medium. The cells were allowed to grow to confluency in 15cm diameter plates. The cells thereafter were cultured in serum free medium for 48 hours prior to harvest. 50ml of supernatant medium was lyophilized after the addition of 100mg human serum albumin. The residue was redissolved in 3ml 1% fetal bovine serum in HDMEM (GIBCO Laboratories, Santa Clara, CA), filtered through a Millex-GS 0.22mM filter (Millipore Corp., Bedford, MA) and assayed in duplicate.

The inhibin hormonal activity in the transformant supernatants was determined by an in vitro bioassay using rat anterior pituitary monolayer culture, Vale, W. et al. Endocrinology, 91, 562-572 (1972). In brief, 21-

day-old female rat anterior pituitaries were collected, enzymatically dispersed and plated in 10% fetal bovine serum in HDMEM (GIBCO Laboratories, Santa Clara, CA) into 24-well tissue culture plates (Falcon Plastic, Oxnard, CA) on day 1. On day 2, the medium was changed to 1% fetal bovine serum in HDMEM, and the transformant medium sample was added. Incubation was continued for another 48 hours. The monolayer medium was then harvested, and the LH and FSH contents were determined by radio-immunoassay (RIA) using materials provided by The Pituitary Hormone Program of NIADDKD. In this assay, the inhibin-containing CHO cell culture inhibits the basal release of FSH but not LH, as compared to control pituitary cells that received the incubation medium only. The amount of porcine inhibin detected in transformant supernatants was 20 ng/ml and exhibited a dose response curve parallel to that obtained with pure porcine ovarian inhibin.

Immunological cross-reactivity is assayed by a sandwich-type radioimmunoassay. Rabbit antisera are raised against purified porcine follicular inhibin by s.c. immunization of rabbits with the porcine inhibin in Freund's complete adjuvant. The presence of anti-inhibin in the antiserum is detected by incubation of the antiserum with purified porcine inhibin and assaying for the formation of an immune complex by conventional techniques, e.g. gel filtration. An aliquot of the antisera is coated onto goat-anti-rabbit IgG precoated polystyrene test tubes. The recombinant culture supernatant or extract is diluted into phosphate buffered saline and added to the coated tubes, incubated overnight and washed. Another aliquot of the rabbit antiserum is added to the test tubes, incubated and washed. Radioiodinated goat antirabbit IgG is added to the tubes, incubated and unbound goat antiserum removed by washing. The recombinant produced inhibin cross-reacts with the rabbit antiserum, as evidenced by bound counts on the test tubes which exceed those of controls incubated with culture medium or extracts from untransformed host cells.

### **EXAMPLE 3**

### Construction of Human Inhibin Vector and Expression of Human Inhibin in Recombinant Cell Culture-I

Expression of human inhibin  $\alpha\beta_A$  facilitated by the discovery that the mature porcine and human  $\beta_A$  chains are identical. Thus, construction of a vector for the expression of human inhibin can proceed from plasmid pSVE- $\beta_A$ -Inh from Example 1, which contains the porcine  $\beta_A$ -encoding cDNA.

A  $\lambda$ gt 10 library of human ovarian cDNA made from 10  $\mu$ g of ovarian mRNA was subjected to Southern analysis using radiophosphate labelled porcine cDNA encoding  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chains.  $\lambda$ HIN $\alpha$ -2 was identified as containing coding regions for the human  $\alpha$  inhibin chain. The prevalence of hybridizing clones in the case of human  $\alpha$  inhibin was considerably less than that found for porcine  $\alpha$  inhibin, on the order of 1 in 100,000 human clones hybridized to the 685 bp Smal fragment of the porcine cDNA for  $\alpha$ Inh. The  $\beta$  chain clones were also rare, with the  $\beta_B$  clones being present at about 3 times the level of  $\beta_A$  (1 and 3 out of about 1,000,000 clones, respectively). None of the  $\beta$  chain clones were full length. They were supplemented with a primed cDNA library and assembled generally as described above for the porcine cDNA. The  $\lambda$  inserts were recovered by EcoR1 digestion.

Plasmids pHlNα-2 is digested with Ncol and Smal, and the 1049 bp 15 fragment (fragment 10) is recovered by gel electrophoresis. pPinα (Example 2) is digested with EcoRl and Pvull. The 98 bp fragment (fragment 11) is recovered by gel electrophoresis. Fragments 10 and 11 are ligated to adaptor I

# 5'-CTGCTCCTCTTGCTGTTGGCCCCACGGAGTGGGCATGGCTGCCAGGGCCCGGAGCTGGACC-3',

in combination with adaptor II which is the complement of adaptor I. The resulting 1208 bp fragment (fragment 12) is treated with Klenow fragment of Pol(I) and the 4 dNTP's and ligated to pHBS348-ESall which has been restricted with HindIII and SacII and blunt-ended as described in Example 1. Alternatively, pPinα was digested with EcoRI and HpaII with the fragment encoding upstream from the HpaII site (that is, the first 21 residues of the porcine sequence) being recovered. The adaptor used in this alternative approach was

5'CGGAGCTCGACC 3'

3' CTCGAGCTGG 5'.

A plasmid pSVE- $H\alpha$ Inh having the correct orientation of fragment 12 is identified by sequence analysis of transformants. This construction (pSVE- $H\alpha$ Inh) thus contains the first 24 residues of the porcine signal sequence with the remainder being prepro human inhibin. Plasmid pSVE- $H\alpha$ Inh is digested with Sall. The fragment containing the SV40 promoter and human inhibin sequence is ligated to fragment 9 and Sall digested pSVE- $\beta_A$ Inh (Example 2). This final plasmid designated pSVE- $h\alpha\beta_A$ Inh-DHFR1 is transfected into DHFR-deficient CHO cells and selected as described in Example 2. The culture supernatant contains hormonally active human inhibin.

### **EXAMPLE 4**

10

15

Construction of Human Inhibin Vector and Expression of Human Inhibin in Recombinant Cell Culture-II

This example is similar to Example 3 except that the pro sequence of human inhibin  $\beta_B$  was employed in the place of the porcine  $\beta_B$  prepro domain.

The lambda gt10 library of Example 3 yielded λHINα2, as described in example 3, together with  $\lambda HIN\beta_A$ -5 and -14. The latter two phage were employed to construct the full length  $\beta_A$  coding cDNA by ligating the 311 bp EcoRI-HindIII fragment (fragment 13) of \( \text{\text{NHNB}}\_{A} - 5 \) to the 1101 bp HindIII-Hpal fragment (fragment 14) of  $\lambda HIN\beta_{A}$ -14 and ligating this mixture in an EcoR1-Smal digested mp18 vector (Biolabs). Clones were selected and screened for the appropriate sized insert. An mp18 vector containing the correct insert was treated with DNA polymerase(I) and the four dNTPs in order to render it double stranded, and thereafter digested with Xbal (which cleaves in the mp18 polylinker sequence), blunted with DNA polymerase I and the four dNTPs, and digested with EcoR1. A 1320 bp fragment (fragment 15) was ligated to the EcoR1-EcoRV fragment 1 from Example 2. This ligation mixture was used to transform E. coli 294 cells. Clones were screened by Southern Hybridization and confirmed by restriction analysis. The clone containing the  $hlnh\beta_A$  coding sequence was designated pSVE-hum $\beta_A$ lnh. A plasmid containing the human  $\beta_A$ coding sequences and the human a-inhibin sequences together with the DHFR gene is constructed from plasmids pSVE-humβ<sub>A</sub>lnh, pSVE-Hαlnh and pFDIISall as outlined above. Specifically, the Sal fragments from pSVE-Halnh and pFDIISall which contain the human alpha inhibin and the DHFR genes were ligated with Sall digested pSVE-humβ<sub>A</sub>Inh and a clone containing all three genes was identified. This plasmid, designated pSVE-humαβ<sub>A</sub>Inh-DHFR2 was transfected into DHFR<sup>-</sup> CHO cells and selected by culture in ght" medium. 24 clones were picked, grown to confluency in ght" medium under conditions conventional for CHO cells for two days, allowed to rest for 2 more days and thereafter the culture media were assayed for inhibin and activin activity using the rat pituitary cell assay described above. 4 clones were found to secrete significant levels of human  $\alpha\beta_A$  inhibin ( $h\alpha\beta_A$ -8, 12, 14, and 18). The levels in the culture medium for each clone were, respectively, 125, 125, 200 and 250 ng/ml. Another clone ( $h\alpha\beta_A$ -11) produced activin as the  $\beta_A\beta_A$  homodimer, but no detectable inhibin, as determined by biological activity and the lack of  $\alpha$ chain immunoreactivity in the culture medium for this clone. Clone  $h\alpha\beta_{A}$ -16 secreted only  $\alpha$  chain and was devoid of activin or inhibin activity.

### EXAMPLE 5

### Recombinant Expression of Human Activin

As reported by Vale et al. (ld.) and Ling et al. (ld.), homodimers and heterodimers of the  $\beta$  chains A and/or B have the opposite effect of inhibin on the pituitary, introducing rather than inhibiting FSH secretion. These proteins, collectively termed activin, are made in  $\alpha$  and  $\beta$  chain cotransformants as described in Example 4. However, somewhat less screening for an appropriate transformant is needed if the initial transfection is conducted with a vector or vectors that do not contain the  $\alpha$  chain gene. A suitable vector is readily constructed from the above-described vectors by excising the  $\alpha$  chain gene. Plasmid pSVE-hum $\beta_A$ Inh from Example 4 is digested with Sall and ligated to fragment 9 (Example 2) containing the DHFR gene. The ligation mixture was used to transfect E. coli 294 cells and colonies selected on the basis of failure to hybridize to the  $\alpha$  chain sequence but which did hybridize to the  $\beta$  chain DNA. A clone pSVE-hum $\beta_A$ Inh-DHFR was identified from which the  $\alpha$  chain DNA has been deleted. This clone is transfected into DHFR<sup>-</sup> CHO cells as described above. Transformants are identified that secrete activin into the culture medium. Similarly, an expression vector containing a  $\beta_B$  coding sequence (reconstituted by ligating DNA encoding the first 34 amino acids of human  $\beta_A$  to the remaining coding sequence of the human  $\beta_B$  chain) is readily constructed and contransfected with pSVE-hum $\beta_A$ Inh-DHFR to produce the heterodimer. The reconstructed human  $\beta_B$  gene also is used in the forgoing plasmids in order to produce  $\alpha$ 

in the in vitro bioassay has essentially equivalent biological potency to the  $\alpha \beta_A$  form of inhibin.

Although the invention has been described with regard to its preferred embodiments, which constitute the best mode presently known to the inventors, it should be understood that various changes and modifications as would be obvious to one having the ordinary skill in the art may be made without departing from the scope of the invention which is set forth in claims appended hereto.

#### Claims

### Claims for the following Contracting States: BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

10. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence but excluding bovine inhibin α chain and the partial bovine inhibin β chain of the sequence

and

30

55

1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.

2. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).

- 3. A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an inhibin  $\beta$  chain, or an amino acid sequence variant thereof, other than native human or porcine  $\beta_A$  or the partial bovine inhibin  $\beta$  chain specified in claim 1.
- 45 4. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.

5. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→Ile or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr

- or Asp, Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu (Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu or Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu or Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human  $\beta_B$  chain
- 6. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin α chain and/or β chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin or a β chain dimer from the culture medium.
  - 7. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
  - 8. The method of any preceding claim wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\alpha$  chain or an inhibin  $\beta$  chain.
  - 9. The method of claim 8 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of both the inhibin α chain and an inhibin β chain.
    - 10. The method of any one of claims 1 to 6, 8 or 9 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
- 20 11. The method of claim 6 wherein the promoter is a viral promoter.
  - 12. The method of claim 11 wherein the promoter is an SV40 promoter.
  - 13. The method of any preceding claim wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
  - 14. The method of any of claims 1 to 7 or 10 to 12 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin β chain and a mature β-chain dimer is recovered free of the α -chain.
- 15. The method of claim 10 or 13 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
  - 16. A composition comprising human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chains being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, but excluding bovine inhibin α chain and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) are cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
  - 17. A composition according to Claim 16 wherein the sequences of said  $\alpha$  and  $\beta$  chains are selected from those depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 18. A composition according to claim 16 wherein said variants are selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
  - 19. A composition according to claim 16 including a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp.

55

10

15

35

45

Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu; Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu or Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu or Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human  $\beta_B$  chain.

- 20. A composition comprising a prodomain of human or porcine α or β<sub>B</sub> inhibin as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β<sub>B</sub> chain), Fig 6A (human α chain), and Fig 9 (human β<sub>B</sub> chain) unassociated with native glycosylation.
  - 21. A composition comprising a homodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> or β<sub>B</sub> chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
  - 22. A composition according to Claim 21 which is a homodimer of mature human or porcine  $\beta_B$  chains or a said amino acid sequence variant thereof.
  - 23. A composition comprising a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, with mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
- 24. Non-chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence excluding bovine inhibin α chain and the partial bovine inhibin β chain of the sequence

Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser

50 and

15

- 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 25. The DNA of claim 24 encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).

- 26. The DNA of claim 24 which encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln-lnhα;[Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly-lnhβ<sub>B</sub>;[Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, wherein lnh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 27. The DNA of claim 24 which encodes a variant of a human β inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparable modified human β<sub>B</sub> chain
- 28. The DNA of any of claims 24 to 27 which is free of intervening untranslated sequences.
- 29. The DNA of any one of claims 24 to 28 which is labelled with a detectable moiety.
  - 30. A replicable vector comprising a DNA of any of claims 21 to 27.
- 31. The vector of claim 30 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.
  - 32. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
- 33. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.
  - 34. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or an inhibin  $\beta$  chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, excluding bovine inhibin  $\alpha$  chain, and the partial bovine inhibin  $\beta$  chain of the sequence

Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-

Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-

Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-

Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser

anc

15

35

40

50

- 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 35. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or an inhibin  $\beta$  chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B

(porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).

- 36. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>256</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]-Inhβ<sub>A</sub>, [Lys 411→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 37. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
  - 38. The cell of any of claims 34 to 37 which is a eukaryotic cell.
  - 39. A cell-free composition that is free of mature α chain polypeptide containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
  - 40. A cell-free composition containing
    - a) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence
    - HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (Amino acids 1-40
- of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8.),
- AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino

acids 83-185 of Fig 8), STWHVFPVSSSIQRLLD-

QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof;

50

45

10

20

25

30

b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino acids

7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

- GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),
- VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino acids 149 195 of Fig 9),
- LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids 198-241 of Fig 9),
- or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain prodomain sequences

KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino

30 acids 1 - 24 of Fig 6),

50

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA
(amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

- **41.** A cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence, and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 42. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.
- 43. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.

- 44. The composition of claim 40 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
  - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
  - b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
- o 45. The composition of any of claims 39 to 44 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
  - 46. The composition of any of claims 39 to 45 which is sterile and wherein the polypeptide further comprises an immunogenic polypeptide.
  - 47. The use of a composition of any of claims 39 to 46 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
  - 48. The composition of any of claims 39 to 46 wherein the polypeptide is conjugated to a detectable group.
  - 49. The composition of claim 48 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
  - 50. The composition of any of claims 39 to 44, 48 or 49 which is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
  - 51. The composition of any of claims 39 to 46, 48 or 49 further comprising a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

### Claims for the following Contracting State: LU

15

20

25

30

35

- 1. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence but excluding bovine inhibin α chain and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 2. A method according to Claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 3. A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an inhibin  $\beta$  chain, or an amino acid sequence variant thereof, other than native human or porcine  $\beta_A$ .
- 4. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly|Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A

- 5. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
- 6. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin  $\alpha$  chain and/or  $\beta$  chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin or a  $\beta$  chain dimer from the culture medium.
- 7. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
- 8. The method of any preceding claim wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin α chain or an inhibin β chain.
  - The method of claim 8 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of both the inhibin α chain and an inhibin β chain.
- 20 10. The method of any one of claims 1 to 6, 8 or 9 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
  - 11. The method of claim 6 wherein the promoter is a viral promoter.

5

10

- 25 12. The method of claim 11 wherein the promoter is an SV40 promoter.
  - 13. The method of any preceding claim wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
- 14. The method of any of claims 1 to 7 or 10 to 12 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\beta$  chain and a mature  $\beta$ -chain dimer is recovered free of the  $\alpha$ -chain.
  - 15. The method of claim 10 or 13 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
- 16. A composition comprising human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chains being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, but excluding bovine inhibin α chain and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) are cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
- 45 17. A composition according to Claim 16 wherein the sequences of said α and β chains are selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 18. A composition according to claim 16 wherein said variants are selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.

19. A composition according to claim 16 including a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>354</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or IIe; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain.

5

10

15

25

30

35

40

- 20. A composition comprising a prodomain of human or porcine  $\alpha$  or  $\beta_B$  inhibin as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta_B$  chain), Fig 6A (human  $\alpha$  chain), and Fig 9 (human  $\beta_B$  chain) unassociated with native glycosylation.
- 21. A composition comprising a homodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> or β<sub>B</sub> chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
- 22. A composition according to Claim 21 which is a homodimer of mature human or porcine  $\beta_B$  chains or a said amino acid sequence variant thereof.
- 23. A composition comprising a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
- 24. Non-chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence excluding bovine inhibin  $\alpha$  chain and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of depicted sequence.
- 25. The DNA of claim 24 encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
- 26. The DNA of claim 24 which encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]-lnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]-lnhβ<sub>B</sub>;[Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, wherein lnh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for lnhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding lnhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 27. The DNA of claim 24 which encodes a variant of a human β inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp;

His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu; Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu or Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu or Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr or Ile; or comparable modified human  $\beta_B$  chain

- 5 28. The DNA of any of claims 24 to 27 which is free of intervening untranslated sequences.
  - 29. The DNA of any one of claims 24 to 28 which is labelled with a detectable moiety.
  - 30. A replicable vector comprising a DNA of any of claims 21 to 27.

15

35

40

- 31. The vector of claim 30 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin α and/or β chains.
- 32. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
- 33. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.
- 34. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, excluding bovine inhibin α chain, and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 35. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
  - 36. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]-lnhβ<sub>A</sub>, [Lys <sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for lnhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding lnhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 37. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
  - 38. The cell of any of claims 34 to 37 which is a eukaryotic cell.
- 39. A cell-free composition that is free of mature α chain polypeptide containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.

|    | 40. A cell-free composition containing a) a polypeptide comprising the human inhibin $\beta_A$ chain prodomain sequence   |
|----|---|
| 5  | HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (Amino acids 1-40  |
|    | of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino   |
| 10 | acids 44-80 of Fig 8.),   |
|    | AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-  |
| 15 | RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino   |
|    | acids 83-185 of Fig 8), STWHVFPVSSSIQRLLD-  |
| 20 | QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),  |
|    | or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin $eta_{\rm B}$ chain prodomain sequence   |
| 25 | CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino acids  |
|    | 7-30 of Fig 9),   |
| 30 | HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-  |
|    | GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS  |
|    | (amino acids 33-145 of Fig 9),  |
| 35 | VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino  |
|    | acids 149 - 195 of Fig 9),  |
| 40 | LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids   |
|    | 198-241 of Fig 9),  |
| 45 | or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or c) a polypeptide free of the mature $\alpha$ chain amino acid sequence comprising the human inhibir chain prodomain sequences |
| 50 | KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino   |
|    | acids 1 - 24 of Fig 6),   |

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSOAILFPATDASCEDKSAARGLAOEAEEGLFRYMFR-

PSOHTRSROVTSAOLWFHTGLDROGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA

(amino acids 32 - 199 of Fig 6),

10

15

30

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

- 41. A cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence, and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 42. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.
  - 43. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
- 44. The composition of claim 40 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
  - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
  - b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
- **45.** The composition of any of claims 39 to 44 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
  - 46. The composition of any of claims 39 to 45 which is sterile and wherein the polypeptide further comprises an immunogenic polypeptide.
- 47. The use of a composition of any of claims 39 to 46 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
  - 48. The composition of any of claims 39 to 46 wherein the polypeptide is conjugated to a detectable group.
- 45 49. The composition of claim 48 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
  - **50.** The composition of any of claims 39 to 44, 48 or 49 which is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
- 50 51. The composition of any of claims 39 to 46, 48 or 49 further comprising a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

# Claims for the following Contracting State : GR

 A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of

insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross, reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.

- 2. A method according to Claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 3. A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an allelic variant of human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain.
- 4. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin α chain and/or β chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin α chain, inhibin β chain, inhibin or a β chain dimer from the culture medium.
  - 5. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.

 The method of any one of the preceding claims wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin α chain or an inhibin β chain.

- 7. A method according to claim 6 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro forms of both the inhibin α chain and an inhibin β chain.
  - 8. The method of any one of claim 1 to 4, 6 or 7 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
- 30 9. The method of claim 4 wherein the promoter is a viral promoter.

10

20

- 10. The method of claim 9 wherein the promoter is an SV40 promoter.
- 11. The method of any preceding claims wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
- 12. The method of any of claims 1 to 5 or 8 to 10 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\beta$  chain and a mature  $\beta$ -chain dimer is recovered free of the  $\alpha$ -chain.
- 13. The method of claim 8 or 11 wherein the β chain is the β<sub>A</sub> chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
- 14. A method according to Claim 4 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, amino acid sequences of said α and β chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 3) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
  - 15. A method according to Claim 14 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an  $\alpha$  and a  $\beta$  chain, the amino acid sequences of said  $\alpha$  and  $\beta$  chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 16. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a prodomain of human or porcine α or β<sub>B</sub> inhibin as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β<sub>B</sub> chain), Fig 6A

(human  $\alpha$  chain), and Fig 9 (human  $\beta_B$  chain) unassociated with native glycosylation.

5

10

25

30

35

40

45

55

- 17. A method according to Claim 4 wherein a  $\beta$  chain dimer is recovered which is a homodimer of mature human or porcine inhibin  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin  $\alpha$  chain.
- 18. A method according to Claim 17 wherein a homodimer of mature human or porcine β<sub>B</sub> chains or a said amino acid sequence variant thereof is recovered.
- 19. A method according to Claim 4 wherein a β chain dimer is recovered which is a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> with mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin α chain.
  - 20. Non chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
  - 21. A DNA according to Claim 20 encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 22. The DNA of claim 20 or 21 which is free of intervening untranslated sequences.
  - 23. The DNA of any one of Claims 20 to 22 which is labelled with a detectable moiety.
  - 24. A replicable vector comprising a DNA of claim 20 or 21.
  - 25. The vector of Claim 24 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.
  - 26. The vector of claim 24 or 25 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 27. The vector of claim 24 or 25 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.
  - 28. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a depicted sequence.

- 29. A host cell according to Claim 28 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or an inhibin  $\beta$  chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
- 5 30. The cell of claim 28 or 29 which is a eukaryotic cell.

10

20

35

- 31. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition, free of mature α chain sequence, containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 32. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing
   a) a polypeptide comprising the human inhibin β<sub>A</sub> chain prodomain sequence

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino acids 1-

40 of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8).

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino acids 83-185 of Fig 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino

acids 7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino acids 149 - 195 of Fig 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids 198-241 of Fig 9),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or

c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain prodomain sequences

KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV (amino acids

1 - 24 of Fig 6),

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSOAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-

GERA (amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

20

25

15

5

- 33. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain polypeptide of a sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raise against a polypeptide of a depicted sequence.
- 34. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.

30

- 35. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta$ <sub>B</sub> chain and the composition is free of mature  $\beta$ <sub>B</sub> chain sequence.
- 36. The method of claim 32 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
  - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
  - b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
  - 37. The method of any of claims 31 to 36 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.

45

- 38. The method of any one of claims 31 to 37 wherein the composition is sterile and further comprising coupling the polypeptide with an immunogenic polypeptide.
- 39. The use of a composition of any of claims 31 to 38 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
  - 40. The method of any of claims 31 to 38 further comprising conjugating the polypeptide to a detectable group.
- 55 41. The method of claim 40 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
  - 42. The method of any of claims 31 to 38, 40, or 41 wherein the composition is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.

43. The method of any of claims 31 to 38 or 40 to 41 further comprising mixing the composition with a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

## 5 Claims for the following Contracting States: AT, ES

10

15

- 1. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 2. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 3. A method according to claim 1 wherein the vector encodes an allelic variant of human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain.
- 4. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin α chain and/or β chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin α chain, inhibin β chain, inhibin or a β chain dimer from the culture medium.
  - 5. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
  - 6. The method of any one of the preceding claims wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\alpha$  chain or an inhibin  $\beta$  chain.
- 7. A method according to claim 6 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro forms of both the inhibin  $\alpha$  chain and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 8. The method of any one of claim 1 to 4, 6 or 7 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
- 40 9. The method of claim 4 wherein the promoter is a viral promoter.
  - 10. The method of claim 9 wherein the promoter is an SV40 promoter.
  - 11. The method of any preceding claims wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
  - 12. The method of any of claims 1 to 5 or 8 to 10 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin β chain and a mature β-chain dimer is recovered free of the α-chain.
- 13. The method of claim 8 or 11 wherein the ß chain is the ßA chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
  - 14. A method according to claim 4 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) are cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or

- 3) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
- 15. A method according to claim 14 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an  $\alpha$  and a  $\beta$  chain, the amino acid sequences of said  $\alpha$  and  $\beta$  chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).

5

15

20

- 16. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a prodomain of human or porcine  $\alpha$  or  $\beta_B$  inhibin as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta_B$  chain), Fig 6A (human  $\alpha$  chain), and Fig 9 (human  $\beta_B$  chain) unassociated with native glycosylation.
- 17. A method according to claim 4 wherein a  $\beta$  chain dimer is recovered which is a homodimer of mature human or porcine inhibin  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin  $\alpha$  chain.
- 18. A method according to claim 17 wherein a homodimer of mature human or porcine β<sub>B</sub> chains or a said amino acid sequence variant thereof is recovered.
- 19. A method according to claim 4 wherein a β chain dimer is recovered which is a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> with mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which heterodimer is free of the inhibin α chain.
- 20. A method for the production of non chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; the method comprising chemical synthesis, screening mRNA from ovary, or screening genomic libraries of any cell.
- 21. A method according to claim 20 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
  - 22. The method of claim 20 or 21 wherein the non-chromosomal DNA is free of intervening untranslated sequences.
  - 23. The method of any one of claims 20 to 22 further comprising the step of labelling the non-chromosomal DNA with a detectable moiety.
- 24. A method for the production of a replicable vector, the method comprising inserting a DNA of claim 20or 21 in a cloning vector.
  - 25. The method of claim 24 wherein the DNA is inserted into a vector which has a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains thereby to produce an expression vector.

- 26. The method of claim 24 or 25 wherein DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain is inserted into the vector.
- 27. The method of claim 24 or 25 wherein DNA encoding an inhibin β chain but not the inhibin α chain is inserted into the vector.
  - 28. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) being cross reactive with cell surface receptors for a polypeptide of a depicted sequence; or 3) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
  - 29. A host cell according to claim 28 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 20 30. The cell of claim 28 or 29 which is a eukaryotic cell.
  - 31. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition free of mature α chain sequences containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 32. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing
   30 a) a polypeptide comprising the human inhibin β<sub>A</sub> chain prodomain sequence

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino acids 1-40 of Fig 8, PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8).

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKANTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA, amino
acids 83-185 of Fig 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof;

50

45

10

15

b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino

acids 7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GOERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-

LEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino

acids 149 - 195 of Fig 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino

acids 198-241 of Fig 9),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or

c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain prodomain sequences

25

10

KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV (amino acids

1 - 24 of Fig 6),

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-

GERA (amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

40

45

- 33. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain polypeptide of a sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 34. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.

onam ooquo

- 35. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
- **36.** The method of claim **32** wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
  - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 11 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or

- b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
- 5 37. The method of any of claims 31 to 36 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
  - 38. The method of any one of claims 31 to 37 wherein the composition is sterile and further comprising coupling the polypeptide to an immunogenic polypeptide.
  - 39. The use of a polypeptide of any of claims 31 to 38 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
- **40.** The method of any of claims 31 to 38 further comprising conjugating the polypeptide to a detectable group.
  - 41. The method of claim 40 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
- 42. The method of any of claims 31 to 38, 40 or 41 wherein the composition is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
  - 43. The method of any of claims 31 to 38 or 40 or 41 further comprising mixing the composition with a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

### Patentansprüche

10

25

30

35

50

55

# Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette mit der Sequenz

und wobei die Variante

- 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B

(Schweine- $\alpha$ -Kette), Fig. 2B (Schweine- $\beta$ -Ketten), Fig. 6A (menschliche  $\alpha$ -Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche  $\beta$ -Ketten) dargestellt sind.

- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine Inhibin-β-Kette oder für eine Aminosäuresequenz-Variante davon kodiert, die von der nativen menschlichen oder Schweine-β<sub>A</sub>-Kette oder der in Anspruch 1 spezifizierten, partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette verschieden ist.
  - 4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn₂₅₅→Gln]Inhα; [Cys₃₂₅ oder Cys₃₂₄→Δ]Inhα; [Cys₃₅₁ oder Cys₃₃₃→Δ]-Inhα; [Lys₃₂₂ oder Lys₃₂₂→Δ]Inβ₄;[Lys₃₂₂→His oder Ser]Inhβ₄; [Lys₃₁₅→Arg; Val₃₁₅→Thr] Inhβ₄;[Cys₃₃₃ oder Cys₃₂₀→Δ]Inhβ₄, [Lys₄₁₁→Gln]Inhβ₄; [Arg₃₁₅→Lys; Val₃₁₅→Thr]InhβՖ; [Cys₃₁ҙ oder Cys₃₂₀→Δ]InhβՖ; [Pro₃₃₁ Gly₃₃₂→ Pro Phe Gly]InhβՖ; [Arg₃₃₅→Gln]InhβՖ, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für InhβՖ die für den entsprechenden Inhβ₄-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschliche Inhibin-β₄-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

10

15

30

- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→IIe oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
  - 6. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
  - 7. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
- 35 8. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 9. Verfahren nach Anspruch 8, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 10. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 6, 8 oder 9, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonal aktives Inhibin produziert wird.
  - 11. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.
  - 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
  - 13. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
  - 14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 7 oder 10 12, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
- 55 15. Verfahren nach Anspruch 10 oder 13, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.

16. Zusammensetzung, umfassend menschliches oder Schweine-Inhibin, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Ketten aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt werden, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette, und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nichtidentifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.

5

10

15

20

25

30

- 17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt werden, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 18. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Varianten ausgewählt werden aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; (Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>220</sub>→Δ]-Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz, sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
- 19. Zusammensetzung nach Anspruch 16, umfassend eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>310</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette.
- 20. Zusammensetzung, umfassend eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
- 21. Zusammensetzung, umfassend ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>-oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von der Inhibin-α-Kette ist.
- 22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, die ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>8</sub>-Ketten oder einer der Aminosäuresequenz-Varianten davon ist.
  - 23. Zusammensetzung, umfassend ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub> mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz

gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung frei von der Inhibin-α-Kette ist.

5 24. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette mit der Sequenz

### und wobei die Variante

25

30

35

40

45

- 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 25. DNA nach Anspruch 24, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
- 26. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>256</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>;[Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
- 27. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante einer menschlichen β-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
  - 28. DNA nach irgendeinem der Ansprüche 24 27, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.

- 29. DNA nach irgendeinem der Ansprüche 24 28, die mit einer feststellbaren Gruppe markiert ist.
- 30. Replizierbarer Vektor, umfassend eine DNA nach irgendeinem der Ansprüche 21 27.
- Vektor nach Anspruch 30, umfassend einen viralen Promotor, der mit der für die Inhibin-α- oder -β-Ketten kodierenden DNA operabel verbunden ist.
  - 32. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 33. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die für eine Inhibin-β-Kette, jedoch nicht für eine eine Inhibin-α-Kette kodiert.
- 34. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette mit der Sequenz

und wobei die Variante

10

40

45

50

- 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt
- 35. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schwein-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 36. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den SchweineInhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub>
  oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>;[Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>;[Cys<sub>388</sub> oder
  Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>;
  [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und
  die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig.
  2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder
  Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364
   376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher αKetten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

- 37. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus: Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
- 38. Zelle nach irgendeinem der Ansprüche 34 37, die eine eukaryotische Zelle ist.
- 39. Zellfreie Zusammensetzung, die frei von reifem α-Ketten-Polypeptid ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
- Zellfreie Zusammensetzung, umfassend
   a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Prodomänensequenz

**HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL** 

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG

(Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

(Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8) STWHVFPVSSSIQRLLD-

OGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG

(Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_B$ -Ketten-Prodomänensequenz

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV

(Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

55

50

10

15

20

25

30

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GOERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS

(Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE

(Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

15

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen α-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die menschlichen Inhibin-α-Ketten-Prodomänensequenzen

20

50

55

# KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSOHTRSROVTSAOLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA (Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

- 41. Zellfreie Zusammensetzung, umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
  - 42. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_A$ -Kette und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta_A$ -Ketten-Sequenz ist.
- 45. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die β-Kette die β<sub>B</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.
  - 44. Zusammensetzung nach Anspruch 40, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
    - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die dargestellt wird durch die Aminosäuren: 28 58; 61 87; 90 108; 111 179; 182 213; 216 258; oder 28 87 aus Fig. 2B; oder
    - b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die dargestellt werden durch die Aminosäuren: 20 54 oder 70 228 aus Fig. 1B.
  - 45. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 44, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.

- 46. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 45, die steril ist, und worin das Polypeptid weiters ein immunogenes Polypeptid umfaßt.
- 47. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
- 48. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46, worin das Polypeptid an eine feststellbare Gruppe konjugiert ist.
- 10 49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - 50. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 44, 48 oder 49, die durch nicht-kovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
- 5 51. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46, 48 oder 49, weiters umfassend eine physiologisch annehmbare, implantierbare Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polypeptids in die Gewebe eines Tieres.

### Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: LU

20

25

30

35

5

- 1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibinα-Kette, und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine andere Inhibin-β-Kette als die native menschliche oder Schweine-β<sub>A</sub>-Kette oder für eine Aminosäuresequenz-Variante davon kodiert.
- **‡**0
- 4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>;[Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]-Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind, kodiert.
- 50

55

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→lle oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; lle<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; lle<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or lle; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette kodiert.

- 6. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
- 7. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
- 8. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- Verfahren nach Anspruch 8, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- 10. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 6, 8 oder 9, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
  - 11. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.
  - 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.

20

30

35

40

50

55

- Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
- 14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 7 oder 10 12, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
  - 15. Verfahren nach Anspruch 10 oder 13, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_A$ -Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 16. Zusammensetzung, umfassend menschliches oder Schweine-Inhibin, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Ketten aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt werden, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette, und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nichtidentifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.
  - 17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt werden, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
  - 18. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Varianten ausgewählt werden aus: den Schwein-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]-Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nurmern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 16, umfassend eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> Hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen β<sub>B</sub>-Kette.

5

10

15

20

25

30

40

45

50

- 20. Zusammensetzung, umfassend eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Kette), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
  - 21. Zusammensetzung, umfassend ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>-oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - Zusammensetzung nach Anspruch 21, die ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>B</sub>Ketten oder einer der Aminosäuresequenz-Varianten davon ist.
- 23. Zusammensetzung, umfassend ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub> mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung frei von der Inhibin-α-Kette ist.
- 24. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette, und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 25. DNA nach Anspruch 24, die für eine menschliche oder Schwein-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schwein-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
- 26. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>256</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkurzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder

Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 - 297, 364 - 376 und 387 - 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

- 5 27. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante einer menschlichen β-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→IIe oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder IIe; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
  - DNA nach irgendeinem der Ansprüche 24 27, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
- 29. DNA nach irgendeinem der Ansprüche 24 28, die mit einer feststellbaren Gruppe markiert ist.
  - 30. Replizierbarer Vektor, umfassend eine DNA nach irgendeinem der Ansprüche 21 27.

30

- 31. Vektor nach Anspruch 30, umfassend einen viralen Promotor, der mit der für die Inhibin-α- oder -β20 Ketten kodierenden DNA operabel verbunden ist.
  - Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibinβ-Kette kodiert.
- 25 33. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die für eine Inhibin-β-Kette, jedoch nicht für eine eine Inhibin-g-Kette kodiert.
  - 34. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette, und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 35. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 36. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oder Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung tür Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
- 37. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus: Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr;

 $Val_{364} \rightarrow Phe$ ;  $Val_{364} \rightarrow Leu$ ;  $Tyr_{375} \rightarrow Thr$ ;  $Tyr_{376} \rightarrow Trp$ ;  $Asn_{389} \rightarrow Gln$ , His oder Lys;  $Ile_{391} \rightarrow Leu$  oder Thr;  $Met_{390} \rightarrow Leu$  oder Ser;  $Val_{392} \rightarrow Phe$ , Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche  $\beta_B$ -Kette kodiert.

- 5 38. Zelle nach irgendeinem der Ansprüche 34 37, die eine eukaryotische Zelle ist.
  - 39. Zellfreie Zusammensetzung, die frei von reifem α-Ketten-Polypeptid ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
  - 40. Zellfreie Zusammensetzung, umfassend
    - a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin-\$\mathcal{\beta}\_A\text{-Ketten-Prodom\text{\text{ennsequenz}}}

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG

(Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

(Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8) STWHVFPVSSSIQRLLD-

30 QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG

(Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon;
b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin-ß<sub>n</sub>-Ketten-Prodomänensequenz

# CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV

(Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS

(Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE

<sub>50</sub> (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

55

35

10

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen a-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen Inhibin-a-Ketten-Prodomänensequenzen

# KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSOHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA

(Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

30

35

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

- 41. Zellfreie Zusammensetzung, umfassend ein menschliches oder Schwein-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
  - 42. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta$ -Kette und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta$ -Ketten-Sequenz ist.
- 25 43. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die β-Kette die β<sub>B</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.
  - 44. Zusammensetzung nach Anspruch 40, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
    - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die beschrieben wird durch die Aminosäuren: 28 58; 61 87; 90 108; 111 179; 182 213; 216 258; oder 28 87 aus Fig. 2B; oder
    - b) ein Polypeptid, das frei von der reifen α-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die beschrieben werden durch die Aminosäuren: 20 54 oder 70 228 aus Fig. 1B.
  - 45. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 44, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.
- 46. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 45, die steril ist, und worin das Polypeptid weiters ein immunogenes Polypeptid umfaßt.
  - 47. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
  - 48. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46, worin das Polypeptid an eine feststellbare Gruppe konjugiert ist.
  - 49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - 50. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 44, 48 oder 49, die durch nicht-kovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
- 51. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 39 46, 48 oder 49, weiters umfassend eine physiologisch annehmbare, implantierbare Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polypeptids in die Gewebe eines Tieres.

## Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : GR

5

10

25

30

- 1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine allelische Variante von menschlicher oder
   Schweine-Inhibin-α- und/oder -β-Kette kodiert.
  - 4. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung der Inhibin-α-Kette, Inhibin-β-Kette, von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
  - 5. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
  - 6. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - Verfahren nach Anspruch 6, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- 8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 4, 6 oder 7, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
  - 9. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.
- 40 10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
  - 11. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
- 45 12. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 5 oder 8 10, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
- 13. Verfahren nach Anspruch 8 oder 11, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 14. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α-und einer β-Kette, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Ketten aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt werden, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten besteht, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten

Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht-identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.

- 15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt werden, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 16. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, ist, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.

15

20

40

45

- 17. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
- 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder eine der Aminosäuresequenz-Varianten davon gewonnen wird.
- 19. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - 20. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Antikörpern; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
  - 21. DNA nach Anspruch 20, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
    - 22. DNA nach Anspruch 20 oder 21, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
    - 23. DNA nach irgendeinem der Ansprüche 20 22, die mit einer feststellbaren Gruppe markiert ist.
    - 24. Replizierbarer Vektor, umfassend eine DNA nach Anspruch 20 oder 21.

- 25. Vektor nach Anspruch 24, umfassend einen viralen Promotor, der mit der für die Inhibin-α- oder -β-Ketten kodierenden DNA operabel verbunden ist.
- 26. Vektor nach Anspruch 24 oder 25, der DNA enthält, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibinβ-Kette kodiert.
  - 27. Vektor nach Anspruch 24 oder 25, der DNA enthält, die für eine Inhibin-β-Kette, jedoch nicht für eine eine Inhibin-α-Kette kodiert.
- 28. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
  - 29. Wirtszelle nach Anspruch 28, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
  - 30. Zelle nach Anspruch 28 oder 29, die eine eukaryotische Zelle ist.

25

30

40

45

50

55

- 31. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, die frei von reifer α-Ketten-Sequenz ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
- 32. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend
  - a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

**HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL** 

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

|    | PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG   |
|----|---|
|    | (Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)  |
| 5  | AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-  |
|    | RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA  |
|    | (Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8)   |
| 10 | STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG   |
|    | (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)  |
| 15 | oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_{\rm B}$ -Ketten-Prodomänensequenz |
|    | CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV  |
| 20 | (Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)   |
|    | HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-  |
|    | GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-  |
| 25 | LEKGS (Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)   |
|    | VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE  |
| •• | (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)  |
| 30 | LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI  |
|    | (Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)  |
| 35 | oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder  |

KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV

50

55

Inhibin-a-Ketten-Prodomänensequenzen

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)
HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

c) ein Polypeptid, das frei von der reifen α-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen

PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA
(Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

33. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein

Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.

- 34. Verfahren nach Anspruch 33, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>A</sub>-Ketten-Sequenz ist.
- Verfahren nach Anspruch 33, worin die β-Kette die β<sub>B</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.
- 36. Verfahren nach Anspruch 32, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
  - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die beschrieben wird durch die Aminosäuren: 28 58; 61 87; 90 108; 111 179; 182 213; 216 258; oder 28 87 aus Fig. 2B; oder
  - b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die beschrieben werden durch die Aminosäuren: 20 54 oder 70 228 aus Fig. 1B.
- 37. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 36, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.
- 38. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 37, worin die Zusammensetzung steril ist, und weiters umfassend das Verbinden des Polypeptids mit einem immunogenen Polypeptid.
- 39. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 31 38 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
  - **40.** Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, weiters umfassend das Binden des Polypeptids an eine feststellbare Gruppe.
- 30 41. Verfahren nach Anspruch 40, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - 42. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, 40 oder 41, worin die Zusammensetzung durch nicht-kovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
  - 43. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, 40 oder 41, weiters umfassend das Mischen der Zusammensetzung mit einer physiologisch annehmbaren, implantierbaren Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polypeptids in die Gewebe eines Tieres.

# 40 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, ES

10

15

20

35

45

- 1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.

- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine allelische Variante von menschlicher oder Schweine-Inhibin-α- und/oder -β-Kette kodiert.
- 4. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung der Inhibin-α-Kette, Inhibin-β-Kette, von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
  - 5. Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
  - Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- Verfahren nach Anspruch 6, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 4, 6 oder 7, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
- 9. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.

15

30

- 10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
- Verfahren nach irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschli ches Inhibin gewonnen wird.
  - 12. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 5 oder 8 10, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
  - Verfahren nach Anspruch 8 oder 11, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 14. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α-und einer β-Kette, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Kette aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt werden, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten besteht, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht-identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.
  - 15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt werden, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
  - 16. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, ist, die mit der nativen Glykosylierung nicht assoziiert ist.
  - 17. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung

oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, worin ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder eine der Aminosäuresequenz-Varianten davon gewonnen wird.

10

15

20

25

30

- 19. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Antikörpern; 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Heterodimer frei von der Inhibin-α-Kette ist
  - 20. Verfahren zur Herstellung von nicht-chromosomaler DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz nd 1) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Verfahren chemische Synthese, Screenen von mRNA aus dem Eierstock oder Screenen der genomischen Sammlungen jeder Zelle unfaßt.
- 21. Verfahren nach Anspruch 20, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
- 22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, worin die nicht-chromosomale DNA frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
  - 23. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 20 22, weiters umfassend den Schritt des Markierens der nicht-chromosomalen DNA mit einer feststellbaren Gruppe.
- 45 24. Verfahren zur Herstellung eines replizierbaren Vektors, wobei das Verfahren das Einfügen einer DNA nach Anspruch 20 oder 21 in einen Klonungsvektor umfaßt.
  - 25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die DNA in einen Vektor eingefügt wird, der einen viralen Promotor besitzt, der mit der für die Inhibin-α- und/oder -β-Ketten kodierenden DNA operabel verbunden ist, um dadurch einen Expressionsvektor zu produzieren.
  - 26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin DNA, die sowohl für eine Inhibin-α-als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert, in den Vektor eingefügt wird.
- 27. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin DNA, die für eine Inhibin-β-Kette, jedoch nicht für eine eine Inhibin-α-Kette kodiert, in den Vektor eingefügt wird.

- 28. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern; oder 2) kreuzreaktiv mit Zelloberflächen-Rezeptoren für ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist; oder 3) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 29. Wirtszelle nach Anspruch 28, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 18 (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 30. Zelle nach Anspruch 28 oder 29, die eine eukaryotische Zelle ist.
- 31. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, die frei von reifer α-Ketten-Sequenz ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine Aminosäuresequenz-Variante einer dieser Prodomänen-Sequenzen enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
  - 32. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend
    - a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG

(Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

TRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

(Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8)

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG

<sup>75</sup> (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon;

50

5

10

15

25

30

b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin-\$<sub>B</sub>-Ketten-Prodomänensequenz

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV

(Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

HILSRLOMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNONLFVVQASLWLYLKLLPYV-

LEKGS (Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE

(Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

LNLDVQCDSCOELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

20

40

55

10

15

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen α-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen Inhibin-α-Ketten-Prodomänensequenzen

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA (Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

- oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.
- 33. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
- 45 34. Verfahren nach Anspruch 33, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>A</sub>-Ketten-Sequenz ist.
  - 35. Verfahren nach Anspruch 33, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta$ <sub>B</sub>-Kette und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta$ <sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.
  - 36. Verfahren nach Anspruch 32, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
    - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die beschrieben wird durch die Aminosäuren: 28 58; 61 87; 90 108; 111 179; 182 213; 216 258; oder 28 87 aus Fig. 2B; oder
    - b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die beschrieben werden durch die Aminosäuren: 20 54 oder 70 228 aus Fig. 1B.

- Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 36, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.
- 38. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 37, worin die Zusammensetzung steril ist, und weiters umfassend das Verbinden des Polypeptids mit einem immunogenen Polypeptid.
- 39. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 31 38 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
- Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, weiters umfassend das Konjugieren des Polypeptids an eine feststellbare Gruppe.
  - 41. Verfahren nach Anspruch 40, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
- 42. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, 40 oder 41, worin die Zusammensetzung durch nicht-kovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
  - 43. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 31 38, 40 oder 41, weiters umfassend das Mischen der Zusammensetzung mit einer physiologisch annehmbaren, implantierbaren Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polypeptids in die Gewebe eines Tieres.

### Revendications

20

30

Revendications pour les Etats contractants suivants : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'aminoacides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée mais excluant la chaîne α d'inhibine bovine et la chaîne β partielle d'inhibine bovine de séquence

45 E

- 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée, ou 3) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 2. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 3. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour une chaîne β d'inhibine, ou un de ses variants de séquence d'amino-acides, autre que la chaîne β<sub>A</sub> humaine ou porcine naturelle ou la chaîne β d'inhibine bovine partielle spécifiée dans la revendication 1.

4. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]-Inhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>389</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>, ; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquel lnh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la lnhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de lnhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.

10

15

20

25

30

- 5. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou lle; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et contenant l'étape supplémentaire de séparation de l'inhibine ou d'un dimère de chaîne β du milieu de culture.
- 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
- 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.
  - Procédé suivant la revendication 8, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro de la chaîne α d'inhibine et de la chaîne β d'inhibine.
- 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, 8 et 9, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
  - 11. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.
- 40 12. Procédé suivant la revendicatioon 11, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
  - 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
- 45 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 10 à 12, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
- 15. Procédé suivant la revendication 10 ou 13, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_A$  et l'inhibine présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml de milieu de culture.
  - 16. Composition contenant de l'inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, mais à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés

contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présentent une réactivité croisée avec les récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.

- 17. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les séquences des chaînes α et β sont choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 18. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les variants sont choisis entre : des dérivés d'inhibine porcine (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα ; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα ; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub> ; Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquels Inh représente une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine β<sub>A</sub> possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence réprésentée sur la figure 8 ; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
  - 19. Composition suivant la revendication 16, comprenant un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu ; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys ; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe ; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe ; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val ; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr ; His<sub>318</sub>→Lys ; Ala<sub>319</sub>→Ser ; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His ; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr ; His<sub>353</sub>→Asp ; His<sub>353</sub>→Lys ; (un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>) ; Phe<sub>356</sub>→Tyr ; Val<sub>364</sub>→Phe ; Val<sub>364</sub>→Leu ; Tyr<sub>375</sub>→Thr ; Tyr<sub>376</sub>→Trp ; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys ; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr ; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser ; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou lle ; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.

25

45

50

- 20. Composition comprenant un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé à une glycosylation naturelle.
- 21. Composition comprenant un homodimère de chaînes β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une des séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui Présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
- 22. Composition suivant la revendication 21, qui est un homodimère!de chaînes β humaine ou porcine mature ou d'un de ses variants de séquence d'amino-acides.
  - 23. Composition comprenant un hétérodimère d'inhibine β<sub>A</sub> humaine ou porcine mature avec l'inhibine β<sub>B</sub> humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'aminoacides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) présentant une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
  - 24. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont décrites sur les figures 1B

(chaîne  $\alpha$  porcine), 2B (chaînes  $\beta$  porcines), 6A (chaîne  $\alpha$  humaine) et 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines) ou pour un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, le variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine bovine et de la chaîne  $\beta$  d'inhibine bovine partielle de séquence

Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser,

et

15

20

25

30

- 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée, ou 3) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 25. ADN suivant la revendication 24, codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 26. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>322</sub>→Δ]-Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inh<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondants (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 27. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant d'une chaîne β d'inhibine humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou lle; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 28. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 27, qui est dépourvu de séquences non traduites intermédiaires.
- 29. ADN suivant l'une quelconque des revendication 24 à 28, qui est marqué avec un groupement détectable.
  - 30. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant l'une quelconque des revendications 21 à 27.
- 31. Vecteur suivant la revendication 30, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes α et/ou β d'inhibine.
  - 32. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine.

- 33. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant pour une chaîne  $\beta$  d'inhibine, mais pour la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.
- 34. Cellule hôte transformation avec un vecteur réplicable comprenant l'ADN codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une telle séquence représentée, le variant étant pratiquement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine et de la chaîne β d'inhibine bovine partielle de séquence

```
Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser,
```

et

5

10

25

30

35

- 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée, ou 3) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 35. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'inhibine humaine porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 36. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant choisi entre : des dérivés d'ihibine porcine [Asn<sub>265</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de, chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293-297, 364-376 et 387-398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 37. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant d'une chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine choisie entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu ; Gln<sub>297</sub>→Asp!ou Lys ; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe ; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe ; Ile<sub>311</sub>→Phe ou Val ; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr ; His<sub>318</sub>→Lys ; Ala<sub>319</sub>→Ser ; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His ; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr ; His<sub>353</sub>→Asp ; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>) ; Phe<sub>356</sub>→Tyr ; Val<sub>364</sub>→Phe ; Val<sub>364</sub>→Leu ; Tyr<sub>375</sub>→Thr ; Tyr<sub>376</sub>→Trp ; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys ; Ile<sub>391</sub>→Leu ou Thr ; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser ; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile ; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
  - 38. Cellule suivant l'une quelconque des revendications 34 à 37, qui est une cellule eucaryotique.
- 39. Composition acellulaire qui est dépourvue d'un polypeptide de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'aminoacides engendré par une insertion, délétion ou substitution d'une telle séquence de prodomaine, le

variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.

- 40. Composition acellulaire contenant
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne \$ d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (aminoacides 1 à 40

10

- de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),
- AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEBAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (aminoacides 83 à 185 de la figure 8), STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQ-CQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_B$  d'inhibine humaine

25

CTSCGGFRRPEELGRV-

DGDFLEAV (amino-acides) 7-30 de la figure 9, HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

- GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS (amino-acides 33 à 5 de la figure 9),
  - VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-acides 149 à 195 de la figure 9),
  - LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),
- ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes α mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine
- KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (aminoacides 1 à 24 de la figure 6),

  HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-
- APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA (amino-acides 32 à 199 de la figure 6),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère.

41. Composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypepti-

de d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.

- 42. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne β et la chaîne β<sub>A</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>A</sub> mature.
- 43. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_B$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\beta_B$  mature.
- 44. Composition suivant la revendication 40, dans laquelle le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les amino-acides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les amino-acides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ; ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou
  - b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature comprenant les séquences de polypeptides de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.
- 45. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, dans laquelle le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
  - 46. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 45, qui est stérile et dans laquelle le polypeptide comprend en outre un polypeptide immunogène.
  - 47. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier audit polypeptide.
- 48. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, dans laquelle le polypeptide est conjugué à un groupe détectable.
  - 49. Composition suivant la revendication 48, dans laquelle le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
- 50. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, 48 et 49, qui est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
  - 51. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, 48 et 49, comprenant en outre une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

# Revendications pour l'Etat contractant suivant : LU

15

25

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée mais excluant la chaîne α d'inhibine bovine et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
  - Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne

 $\alpha$  humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines).

10

15

20

- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour une chaîne β d'inhibine, ou un de ses variants de séquence d'amino-acides, autre que la β<sub>A</sub> humaine ou porcine naturelle.
- 4. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]-lnhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>389</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquel lnh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la lnhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de lnhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des'variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 5. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→Ile ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>377</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et contenant l'étape supplémentaire de séparation de l'inhibine ou d'un dimère de chaîne β du milieu de culture.
- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine d'une chaîne β d'inhibine.
  - 9. Procédé suivant la revendication 8, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme de pré-pro de la chaîne α d'inhibine et de la chaîne β d'inhibine.
- 40 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, 8 et 9, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
  - 11. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.
- 45 12. Procédé suivant la revendication 11, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
  - Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
- 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 10 à 12, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
- 15. Procédé suivant la revendication 10 ou 13, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et l'inhibine présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml de milieu de culture.
  - 16. Composition contenant de l'inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , les séquences d'amino-acides desdites chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  étant choisies entre celles représentées sur la

figure 1B (chaîne  $\alpha$  porcine), la figure 2B (chaînes  $\beta$  porcines), la figure 6A (chaîne  $\alpha$  humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, mais à l'exclusion de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine bovine, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présentent une réactivité croisée avec les récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.

- 17. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les séquences des chaînes α et β sont choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 18. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les variants sont choisis entre : des dérivés d'inhibine porcine (Asn<sub>266</sub>→In]GInhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα ; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα ; [Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub> ; Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→GIn]Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→GIn]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquels Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence réprésentée sur la figure 8 ; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
  - 19. Composition suivant la revendication 16, comprenant un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu ; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys ; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe ; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe ; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val ; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr ; His<sub>318</sub>→Lys ; Ala<sub>319</sub>→Ser ; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His ; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr ; His<sub>353</sub>→Asp ; His<sub>353</sub>→Lys ; (un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>) ; Phe<sub>356</sub>→Tyr ; Val<sub>364</sub>→Phe ; Val<sub>364</sub>→Leu ; Tyr<sub>375</sub>→Thr ; Tyr<sub>376</sub>→Trp ; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys ; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr ; Met<sub>391</sub>→Leu ou Ser ; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile ; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.

30

40

45

- 25. Composition comprenant un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représenté sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé à une glycosylation naturelle.
  - 21. Composition comprenant un homodimère de chaînes β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une des séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
- 22. Composition suivant la revendication 21, qui est un homodimère de chaînes β<sub>B</sub> humaine ou porcine mature ou d'un de ses variants de séquence d'amino-acides.
  - 23. Composition comprenant un hétérodimère de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec une chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un

polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.

- 24. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
  - 25. ADN suivant la revendication 24 codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'aminoacides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).

15

25

30

- 26. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα ; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα ; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]-lnhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub> ; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquels lnh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la lnhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de lnhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8 ; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 27. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β humaine choisi entre ; Phe<sub>302</sub>→Ile ou Leu ; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys ; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe ; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe ; Ile<sub>311</sub>→Phe ou Val ; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr ; His<sub>318</sub>→Lys ; Ala<sub>319</sub>→Ser ; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His ; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr ; His<sub>353</sub>→Asp ; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>) ; Phe<sub>356</sub>→Tyr ; Val<sub>364</sub>→Phe ; Val<sub>364</sub>→Leu ; Tyr<sub>375</sub>→Thr ; Tyr<sub>376</sub>→Trp ; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys ; Ile<sub>391</sub>→Leu ou Thr ; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser ; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile ; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 28. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 27, qui est dépourvue de séquences non traduites intermédiaires.
- 29. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 28, qui est marquée avec un groupement détectable.
  - 30. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant l'une quelconque des revendications 21 à 27.
  - 31. Vecteur suivant la revendication 30, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes  $\alpha$  et/ou  $\beta$  d'inhibine.
    - 32. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine.
- 33. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant pour une chaîne β d'inhibine mais non pour la chaîne α d'inhibine.

- 34. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine et/ou la chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine, et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée, ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 35. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et/ou une chaîne  $\beta$  d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne  $\alpha$  porcine), la figure 2B (chaînes  $\beta$  porcines) la figure 6A (chaîne  $\alpha$  humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines).
- 36. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquels lnh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour lnhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de lnhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 37. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou lle; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
  - 38. Cellule suivant l'une quelconque des revendications 34 à 37, qui est une cellule eucaryotique.
  - 39. Composition acellulaire qui est dépourvue de polypeptide de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par une insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
  - 40. Composition acellulaire contenant

50

40

45

10

15

20

25

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta$  d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVRAVKKHILNMLHL (amino-acides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8), AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino-

acides 83 à 185 de la figure 8), STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVR-IACEOCOESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ;
b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne <sub>B</sub>ß d'inhibine humaine

CTSCGGFRRPEELGRVD-

20 GDFLEAV (amino-acides) 7 à 30 de la figure 9,

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS

(amino-acides 33 à 145 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (aminoacides 149 à 195 de la figure 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou

c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine

KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure 6),

40

35

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6),

ou un de leurs variants de séquence d'aminoacides naturels de mammifère.

41. Composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés

contre un polypeptide d'une séquence représentée.

15

30

40

45

50

- 42. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>A</sub> mature.
- 43. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne β est la chaîne β<sub>B</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>B</sub> mature.
- 44. Composition suivant la revendication 40, dans laquelle le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les amino-acides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les amino-acides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ; ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou
  - b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne α mature comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne α d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.
- 45. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, dans laquelle le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
  - 46. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 45, qui est stérile et dans laquelle le polypeptide comprend en outre un polypeptide immunogène.
- 47. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier audit polypeptide.
  - 48. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, dans laquelle le polypeptide est conjugué à un groupe détectable.
  - 49. Composition suivant la revendication 48, dans laquelle le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
- 50. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, 48 et 49, qui est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
  - 51. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, 48 et 49, comprenant en outre une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

### Revendications pour l'Etat contractant suivant : GR

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui comprend un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (-(chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée, ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 2. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).

- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour un variant allélique d'une chaîne α et/ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine.
- 4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est liée de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et comprenant l'étape supplémentaire consistant à séparer la chaîne α d'inhibine, la chaîne β d'inhibine, l'inhibine ou un dimère de chaîne β du milieu de culture.
- 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
  - 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.
- 7. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour les formes pré-pro de la chaîne α d'inhibine et d'une chaîne β d'inhibine.
  - 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6 et 7, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et de l'inhibine douée d'activité hormonale est produite.
  - 9. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.

20

30

50

- 10. Procédé suivant la revendication 9, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
  - 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 8 à 10, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
  - 13. Procédé suivant la revendication 8 ou 11, dans lequel la chaîne  $\beta$  et la chaîne  $\beta_A$  et l'inhibine est présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml dans le milieu de culture.
- 14. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; avec les récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée; ou 3) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.
  - 15. Procédé suivant la revendication 14, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 16. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β<sub>B</sub> porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaînes β humaines), non associé à une glycosylation naturelle.
  - 17. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne  $\beta$  qui est un homodimère de chaînes  $\beta$  ou  $\beta_B$  d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant

représentées sur la figure 2B (chaînes  $\beta$  porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; dimère qui est dépourvu de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.

- 18. Procédé suivant la revendication 17, dans lequel un homodimère de chaînes β<sub>B</sub> humaines ou porcines matures ou d'un d'un de leurs variants de séquence d'amino-acides est recueilli.
  - 19. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne β qui est un hétérodimère de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec une chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée; dimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.
  - 20. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine, la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1)
- qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 21. ADN suivant la revendication 20, codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 40 22. ADN suivant la revendication 20 ou 21, qui est dépourvue de séquences non traduites intermédiaires.
  - 23. ADN suivant l'une quelconque des revendications 20 à 22, qui est marqué avec un groupement détectable.
- 45 24. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant la revendication 20 ou 21.

15

20

25

- 25. Vecteur suivant la revendication 24, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes α et/ou β d'inhibine.
- 50 26. Vecteur suivant la revendication 24 ou 25, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne α d'inhibine et une chaîne β d'inhibine.
  - 27. Vecteur suivant la revendication 24 ou 25, qui contient un ADN codant pour une chaîne β d'inhibine, mais non pour la chaîne α d'inhibine.
  - 28. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines),

la figure 6A (chaîne  $\alpha$  humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'une séquence représentée.

- 29. Cellule hôte suivant la revendication 28, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 30. Cellule suivant la revendication 28 ou 29, qui est une cellule eucaryotique.

10

15

20

40

- 31. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition cellulaire, dépourvue de séquence de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences représentées et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 32. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (aminoacides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (aminoacides 83 à 185 de la figure 8), STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQ-CQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_B$  d'inhibine humaine

CTSCGGFRRPEELGRVDG-

45 DFLEAV (amino-acides) 7 à 30 de la figure 9, HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS (amino-acides 33-145 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-acides 149 à 195 de la figure 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou

c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine

5 KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure 6),

HALGGFTHRGSEPEEEDVSOAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

10 PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA

15

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère.

20

25

40

50

- 33. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences polypeptidiques de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 34. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_A$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\beta_A$  mature.
  - 35. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_B$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\beta_B$  mature.
- 35. Procédé suivant la revendication 32, dans lequel le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, la composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : des amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les amino-acides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les amino-acides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou
  - b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature, comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.
- 45 37. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 36, dans lequel le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
  - 38. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 37, dans lequel la composition est stérile, et comprend en outre le couplage du polypeptide à un polypeptide immunogène.

39. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier au polypeptide.

- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, comprenant en outre la conjugaison du polypeptide à un groupe détectable.
  - Procédé suivant la revendication 40, dans lequel le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.

- 42. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, 40 et 41, dans lequel la composition est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
- 43. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 ou 40 à 41, comprenant en outre le mélange de la composition à une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

### Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, ES

10

15

20

25

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'aminoacides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une activité croisée avec les anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 2. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour un variant allélique de chaîne α et/ou de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine.
- 4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte, et comprenant l'étape supplémentaire de séparation de la chaîne α d'inhibine, de la chaîne β d'inhibine, de l'inhibine ou d'un dimère de chaîne β du milieu de culture.
- 35 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
  - 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.

40

- Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour les formes pré-pro de la chaîne α d'inhibine et d'une chaîne β d'inhibine.
- 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6 et 7, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
  - 9. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.
  - Procédé suivant la revendication 9, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.

- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel une inhibine porcine humaine mature est recueillie.
- 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 8 à 10, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.

5

10

15

20

30

35

- 13. Procédé suivant la revendication 8 ou 11, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_A$  et l'inhibine est présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml dans le milieu de culture.
- 14. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine), et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et les variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui présentent une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présentent une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présentent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines identifiées.
- 15. Procédé suivant la revendication 14, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'aminoacides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 16. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé et à une glycosylation naturelle.
- 17. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recuelli un dimère de chaîne β qui est un homodimère de chaîne β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes βhumaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représenté ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; dimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.
- 18. Procédé suivant la revendication 17, dans lequel un homodimère de chaînes β<sub>B</sub> humaines ou porcines matures ou un de ses variants de séquence d'amino-acides est recueilli.
- 40 19. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne β qui est un hétérodimère de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec la chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant présentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'aminoacides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représenté ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; homodimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.
  - 20. Procédé de production d'un ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représentée; ou 3)

qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée, procédé comprenant une synthèse chimique, une sélection d'ARNm d'ovaires ou une sélection de banques génomiques de n'importe quelle cellule.

- 21. Procédé suivant la revendication 20, dans lequel l'ADN code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) ou la figure 8 ou 9 (chaînes β humaines).
- 22. Procédé suivant la revendication 20 ou 21, dans lequel l'ADN non chromosomique est dépourvu de séquences non traduites intermédiaires.
  - 23. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 22, comprenant en outre l'étape de marquage de l'ADN non chromosomique avec un groupement détectable.
  - 24. Procédé de production d'un vecteur réplicable, procédé comprenant l'insertion d'un ADN suivant la revendication 20 ou 21 dans un vecteur de clonage.
- 25. Procédé suivant la revendication 24, dans lequel l'ADN est inséré dans un vecteur qui possède un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine afin de produire ainsi un vecteur d'expression.
  - 26. Procédé suivant la revendication 24 ou 25, dans lequel un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine est insérée dans le vecteur.
  - 27. Procédé suivant la revendication 24 ou 25, dans lequel un ADN codant pour une chaîne β d'inhibine mais non pour la chaîne α d'inhibine est inséré dans le vecteur.
- 28. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 29. Cellule hôte suivant la revendication 28, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α d'inhibine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 45 30. Cellule suivant la revendication 28 ou 29, qui est une cellule eucaryotique.

15

- 31. Procédé suivant la revendicatioin 4, dans lequel la chaîne inhibine recueillie est une composition acellulaire dépourvue de séquences de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 55 32. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino-acides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8), AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEABEVGLKGERSELLLSEKVVDA (aminoacides 83 à 185 de la figure 8), STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère;
 b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine

CTSCGGFRRPEELGRVD-

20 GDFLEAV (aminoacides) 7 à 30 de la figure 9, HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-

GOERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS (amino-acides 33 à 145 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-acides

30 149 à 195 de la figure 9), LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine

#0 KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure 6) HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

45 APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6),

35

50

- ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère.
- 33. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences polypeptidiques de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.

- 34. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_A$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\alpha_A$  mature.
- 35. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>B</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>B</sub> mature.

5

10

15

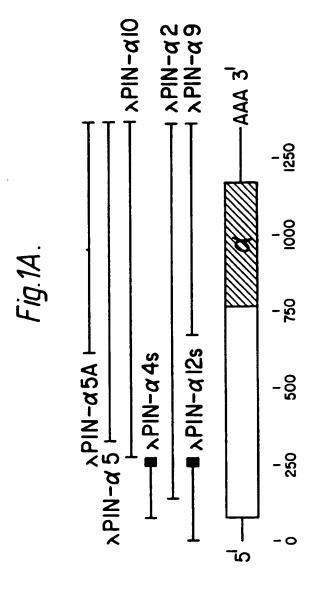
25

40

45

50

- 36. Procédé suivant la revendication 32, dans lequel le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, la composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les amino-acides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les amino-acides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou
  - b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature, comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.
- 37. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 36, dans lequel le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
- 20 38. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 37, dans lequel la composition est stérile, et comprenant en outre le couplage du polypeptide à un polypeptide immunogène.
  - 39. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier au polypeptide.
  - 40. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, comprenant en outre la conjugaison du polypeptide à un groupe détectable.
- 41. Procédé suivant la revendication 40, dans lequel le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
  - 42. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, 40 et 41, dans lequel la composition est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
  - 43. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 ou 40 à 41, comprenant en outre le mélange de la composition à une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

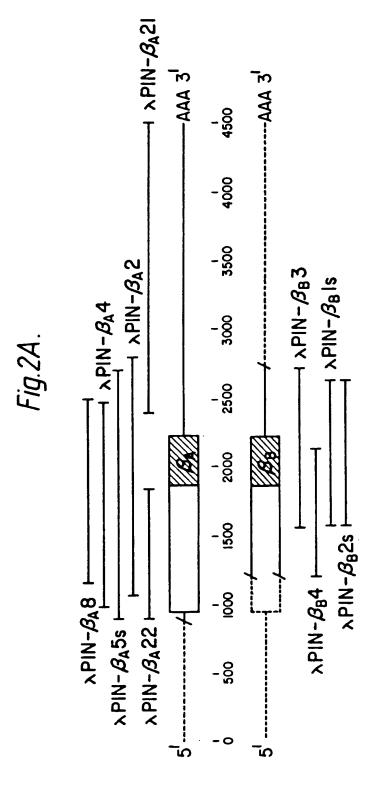


## Fia. 18(I.)

| Pro   | ord<br>CCC                               | g lu<br>GAG   | arg<br>CGG                            | h i s<br>CAC       | ala<br>GCT                 | Jeu<br>CTG                 |
|---|--|---|---------------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| a]a<br>600  | 91y<br>66A                               | ser<br>TCT  | a]a<br>600                            | phe<br>TTC         | va]<br>GTG                 | val<br>GTC                 |
| 10<br>1eu<br>776  | 40<br>Jeu<br>TTG                         | 91.70<br>91.70  | 100<br>leu<br>CTG                     | 130<br>trp<br>TGG  | 160<br>Pro<br>CCT          | 190<br>CCA                 |
| leu<br>CTG  | ala<br>GCC                               | arg arg   | g Ju<br>GAG                           | leu<br>CTG         | 91 <i>y</i><br>661         | his                        |
| leu<br>TTG  | asp<br>GAT                               | arg<br>000  | 91y<br>66A                            | gln<br>CAG         | arg<br>AGG                 | thr                        |
| leu<br>CTC  | leu<br>CTG                               | me t<br>ATG   | ala<br>GCT                            | ala gln<br>GCT CAG | ser<br>TCC                 | leu<br>TTG                 |
| leu<br>CTC  | phe<br>TTC                               | phe<br>TTC  | ala<br>GCT                            | ser<br>TCA         | ser<br>TCA                 | Jeu<br>TTG                 |
| leu<br>CTG  | leu<br>CTG                               | gly phe<br>GGC TTC  | CCA<br>CCA                            | thr<br>ACT         | Jeu<br>CTA                 | pro<br>CCT                 |
| gln   | ala<br>GCT                               | val gly<br>GTG GGG  | g]u<br>GAG                            | val<br>GTG         | ala<br>GCA                 | Jeu<br>CTC                 |
| Pro<br>CCT  | arg<br>AGG                               | va]<br>GTG  | asp<br>GAC                            | gln<br>CAG         | leu<br>CTG                 | ala<br>GCC                 |
| trp<br>766  | val<br>GTG                               | ala<br>GCT  | 9 J y<br>666                          | arg<br>CGC         | leu<br>CTG                 | ser<br>TCT                 |
| 1<br>met<br>ATG   | lys<br>AAG                               | h is<br>CAT   | 90 Sys gly asp<br>66T GCC TeT GGG GAC | ser<br>AGC         | asp<br>GAC                 | ala<br>GCC                 |
| AGCT  | 30<br>ala<br>GCC                         | arg arg<br>CGA AGA  | 8                                     | 120<br>his<br>CAC  | 150<br>1eu<br>CTG          | 180<br>ala<br>GCC          |
| 36TG/   | l leu a                                  | gra<br>66A  | ع]ء<br>ورد                            | thr                | o leu l                    | leu<br>CTG                 |
| SCCA(   | va<br>GTI                                | 5<br>2<br>2<br>2<br>2<br>3<br>3   | 91 <i>y</i><br>661                    | his                | ES                         | h is                       |
| TGTGGGGCAGACCCTGACAGAAGGGGCACAGGGCTGGGTGTGGGTTCACCGTTGGCAGGGCCAGGTGAGCT | leu<br>CTT                               | leu<br>CTG  | thr                                   | gln                | 9) y<br>666                | leu his<br>cTG CAC         |
| TT66(   | glu                                      | arg arg<br>AGG CGT  | ala<br>GCT                            | ser<br>TCC         | asn ser ser<br>AAT AGC TCT | val<br>GTG                 |
| ACCG  | arg                                      | Agg   | org<br>500                            | 50<br>500          | se Se                      | ala<br>GCT                 |
| GTTC  | asp<br>GAC                               | val<br>GTC  | phe<br>TTC                            | arg<br>666         | asn                        | trp<br>166                 |
| 6766  | Jeu<br>CTG                               | gly<br>66A  | leu<br>CTT                            | phe<br>TTC         | ار<br>ورو<br>ورد           | arg<br>CGC                 |
| GGGT  | g]u<br>GAG                               | pro<br>CCT  | ile<br>ATC                            | val<br>GTA         | ala<br>GCC                 | org<br>CCT                 |
| GGCT  | org<br>SSS                               | asp<br>GAT  | ala<br>GCC                            | tyr<br>TAT         | ala<br>GCA                 | org<br>222                 |
| ACAG  | 20<br>917<br>660                         | 50<br>91y<br>666  | 80<br>g]n<br>CAG                      | thr<br>ACA         | 140<br>met<br>ATG          | 170<br>ala<br>606          |
| 2999  | gly <b>cys</b> gln<br>GGC <b>TGC</b> CAG | gly glu gly<br>GGG GAA GGT  | val ser<br>GTC TCC                    | phe<br>TTC         | arg gln gly<br>AGA CAG GGG | leu gly gln<br>CTG GGC CAG |
| GAAG  | <b>इ</b> ध                               | g<br>GAA  | val<br>GTC                            | Jeu<br>CTC         | g]n<br>CAG                 | 9] y<br>660                |
| GACA  | 9 Jy<br>660                              | 91y<br>666  | asp<br>GAT                            | 91y<br>66C         | arg<br>AGA                 | leu<br>CTG                 |
| CCCT  | his<br>CAT                               | thr   | 9 Ju<br>GAG                           | 91u<br>GAG         | asp<br>GAC                 | ser<br>TCA                 |
| CAGA  | 91y<br>666                               | val<br>GTG  | g]u<br>GAG                            | g]u<br>GAG         | leu<br>CTG                 | met<br>ATG                 |
| 9999  | ser<br>AGT                               | ala<br>GCA  | g]u<br>GAG                            | ala<br>GCT         | 91 <i>y</i><br>66A         | 53                         |
| 161   | arg                                      | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5 | org<br>CCC                            | 91u<br>6AG         | thr                        | va}<br>GTG                 |
| 7   | 108                                      | 198   | . 588                                 | 378                | 468                        | 558                        |

# Fig. 1B(II)

| 200  | 91 <sup>0</sup>  | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5             | pro<br>CCT  | ser<br>TCG   | သည  | SCAT   |                          |
|--|--|---|---|--|---|--|--------------------------|
| S<br>S<br>S  | ទីនិ   | er<br>CCT   | thr   | thr  | AGCI  | ACA!   |                          |
| 220<br>arg<br>AGG  | 823  | 280<br>55<br>CAC  | 310<br>pro<br>CCT   | 340<br>thr<br>ACC  | ວິວວິ   | ATA  |                          |
| a]a<br>600   | arg<br>AGG   | va]<br>GTG  | 5<br>2<br>2<br>2<br>3   | arg<br>CGC   | .6676   | GACA   |                          |
| arg<br>CGG   | g]n<br>CAG   | ile<br>ATC  | ala<br>GCC  | val<br>GTT   | 10901   | ATGT   |                          |
| thr<br>ACT   | Ge C   | trp ile<br>TGG ATC  | 91y<br>666  | arg<br>CGC   | GTCC  | 66TA   |                          |
| h is<br>CAC  | Jeu<br>CTG   | arg<br>CGG  | Pro<br>CCT  | leu<br>CTA   | GGGTGTCCCGCTGGTGGCCGAGCTCCC                               | CATG   |                          |
| a]a<br>600   | arg<br>CGC   | asp<br>GAC  | val pro gly ala<br>GTC CCT GGG GCC  | ser<br>TCC   | 0C<br>TAA (   | СТСС   |                          |
| va]<br>GTG   | Jeu<br>CTG   | trp<br>TGG  | ser<br>TCT  | arg<br>AGG   | 364<br>ile<br>ATC   | CCCT   |                          |
| leu<br>CTG   | ala<br>606   | 91y<br>66C  | leu<br>CTG  | met<br>ATG   |   | ງງງງ   |                          |
| phe<br>TTC   | ala<br>600   | leu<br>CTG  | 0<br>0<br>0<br>0  | thr  | ala<br>GCC  | CTGT   |                          |
| pro phe leu val ala his thr arg<br>CCC TTC CTG GTG GCC CAC ACT CGG   | ala arg arg ser thr ala pro leu pro trp pro trp ser pro ala ala leu arg leu leu gln arg pro cc | glu leu gly trp asp arg<br>GAG CTG GGC TGG GAC CGG  | leu pro leu ser<br>CTG CCC CTG TCT  | gly thr met arg ser leu arg val<br>GGG ACC ATG AGG TCC CTA CGC GTT                               | 360   | CTCC   |                          |
| 210<br>thr<br>ACC  | 7 s 2<br>2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2   | 270<br>gln<br>CAG   | 300<br>asn<br>AAC   | 330<br>Pro<br>CCG  | 360<br>his<br>CAC   | TCCC   |                          |
| ala<br>GCC   | tr<br>166  | phe<br>TTC  | org<br>CCC  | Jeu<br>CTC   | g]n<br>CAG  | AGGC   |                          |
| ang Cys pro leu Cys ser cys ser ala arg pro glu ala i coc Tet cor ctc Tet Tcc Tee TcA GCC CGG CCC GAG GCC / Sublinit | g<br>S<br>T  | his ala aspicys his arg ala ser leu asn ile ser phe CAC GCC GAC TGC CAC AGA GCT TCC CTC AAC ATC TCC TTC | leu pro<br>CTG CCC  | gly ala gln pro cys cys ala ala leu<br>GGG GCT CAG CCC TGC TGC GCT GCT CTC                       | pro asn leu leu thr gln<br>CCC AAC CTT CTC ACC CAG        | CTG6   |                          |
| 500  | tr<br>58   | ile   | 290<br>his gly gly Cys gly leu pro thr<br>CAC GGG GGC TGC GGG CTG CCC ACC | ala<br>GCT   | leu<br>CTC  | 9933   |                          |
| arg<br>666   | 523  | AAC   | org<br>SSS  | Cys<br>TGC   | leu<br>CTT  | CTCT   |                          |
| ala<br>600<br><b>:</b>   | : 125<br>25<br>25  | leu<br>CTC  | leu<br>CTG  | <b>16</b> 0  | asn   | 993  |                          |
| as TCA   | 85   | ser<br>TCC  | 91y<br>666  | 020  | 970<br>CCC  | 1133   |                          |
| S 25 1   | ala<br>GCC   | ala<br>GCT  | 25  | g In<br>CAG  | thr val<br>ACG GTG  | CTT  |                          |
| 25 Z   | इ इ  | arg<br>AGA  | 917   | ala<br>GCT   | thr   | 2001   |                          |
| % <u>₽</u> ↑   | ser<br>TCC   | his<br>CAC  | 91y<br>666  | 91y<br>666   | g]u<br>GAG  | CACC   |                          |
| 28<br>15<br>15<br>15<br>15   | arg<br>CGC   | 260<br><b>Cys</b><br><b>Tec</b>   | 290<br>his<br>CAC   | 320<br>leu leu val pro<br>TTG TTG GTG CCA  | 350<br>r ser phe lys tyr glu t<br>C TCT TTC AAG TAC GAG A | 1100   | AAA                      |
| cc cc  | arg<br>GSA   | asp   | his tyr cys P   | val<br>GTG   | lys<br>AAG  | AGAG   | GCGCAAAAAAAAA            |
| cy<br>Ter  | ala<br>GCC   | ala<br>GCC  | tyr   | leu<br>TTG   | phe<br>TTC  | AGGC   | CA&                      |
| arg<br>000   | arg<br>AGG   | h is  | his   | leu<br>TTG   | ser<br>TCT  | AGG/   | .TGC6                    |
| 3 <u>e</u>   | 9)<br>686  | val<br>GTG  | appe 770  | Je<br>CT   | ty<br>TAC   | CT66   | 301.                     |
| Jeu<br>CTG   | 91y<br>666   | ala<br>GCT  | ile<br>ATC  | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>7<br>5<br>7<br>5<br>7<br>5 | 9 <sup>1</sup> y<br>66T                                   | CAGO   | TGAC                     |
| leu leu<br>CTG CTG (   | 91y<br>66A   | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>7<br>5<br>7<br>5<br>7<br>5        | phe<br>TTC  | g In<br>CAG  | gly gly tyr<br>GGA GGT TAC                                | ACAGGCACCAGCCTGGAGGAAGGCAGAGTTCCCACCTCCCCTTTCCTTCC | <b>AGTGCAGATGACTCGGT</b> |
| val<br>GTG   | ser<br>AGC   | glu<br>GAA  | ser<br>AGT  | val<br>GTC   | asp<br>GAT  | ACAG   | AGTG                     |
| 648  | 738  | 828   | 918   | 1008   | 1098  | 1194   | 1312                     |



## Fig. 28(I.)

|                    |                                   | 1 1  |  |   |
|--------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| ser<br>TCC         | gln<br>CAG<br>GAC<br>asp          | ala<br>600<br>600<br>ala   | ala<br>GCG<br>AGC<br>ser                 | phe<br>TTC<br>TTC<br>phe                                |
| 20<br>ser<br>AGT   | 50<br>Ser<br>TCT<br>CTG           | 8 8 8 7 8 X  | arg<br>A66<br>600<br>ala                 | arg<br>CGC<br>TAC<br>tyr                                |
| arg<br>AGG         | asn<br>AAC<br>CGG<br>arg          | 2002<br>2002<br>2002   | Agg<br>CAC<br>CAC<br>his                 | Jeu<br>CTG<br>CTG                                       |
| val<br>GTG         | 660<br>91y                        | val<br>GTA<br>GTG  | 919<br>666<br>660<br>1919                | ACG<br>CGC<br>arg                                       |
| ile v<br>ATA (     | val p<br>GTA C<br>CTG G           | 000<br>000<br>000<br>000<br>000<br>000<br>000  | ile g<br>ATC<br>GAC<br>GAC<br>asp        | lys t<br>AAG A<br>GTC C                                 |
| ile i<br>ATT A     | asp v<br>GAT G<br>GAG C<br>GAG C  | gln p<br>CAG C<br>CAT G<br>His a   | asp i<br>GAC A<br>CTG G<br>leu a         | arg 1<br>AGG A<br>CGG G<br>arg v                        |
| trp i<br>TGG A     | lys a<br>AAG G<br>GAG G<br>glu g  | thr<br>Acc C   | asp a<br>GAC G<br>CAC C                  | ser C & a   |
| CVS t<br>160 Ti    | pro 1<br>CCA A<br>GAG GA<br>g1u g | val ti<br>GTC AC<br>ATC AC   | glu a<br>GAG G/<br>CCG C/<br>pro h       |   |
| OH.                |                                   | <b>σ</b> ⊢0 ε<br>Σ <b>Θ</b> Ε ∈  |  | 2 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C                 |
| a ser<br>G AGT     | r leu<br>c cTc<br>6 6c6<br>y ala  | C GAT<br>C AAC<br>D asn  | A ATC                                    | 2 ecc 1 ala s   |
| ala<br>s ece       | Acc<br>a ggg                      |  | 9)u<br>6 66<br>6 66<br>9 10              | 130<br>91y thr<br>66C ACC<br>6AT 66C CTC<br>asp 91y leu |
| l leu              | ala<br>600<br>ala                 | arg<br>CGA<br>arg  | val<br>GTG<br>GTG<br>val                 | E 699 6   |
| 10<br>1eu<br>176   | 40<br>Jeu<br>CTG<br>CCG<br>GCG    | lys<br>AAG<br>GGC<br>91y   | 100<br>147<br>146<br>178<br>179<br>179   | GAT   |
| phe<br>TT          | ala<br>666<br>666<br>arg          | AAG<br>CGG<br>arg  | 91y<br>666<br>660<br>91y                 | el go   |
| 9 J y<br>GGA       | <b>\$</b> [2                      | leu<br>TTG<br>ATG<br>met   | asn<br>AAC<br>GAC<br>asp                 | glu<br>GAA<br>GAG<br>9lu                                |
| arg<br>AGA         | ser                               | his<br>CAC<br>CAG<br>gln   | 91u 8                                    | ala<br>GCG<br>GCA<br>ala                                |
| leu<br>CTG         | 573<br>573                        | leu<br>CTG<br>CTG  | 91y<br>666<br>060<br>060<br>arg          | phe<br>TTC<br>Phe                                       |
| trp<br>TGG         | 555<br>760                        | met<br>ATG<br>CGC<br>arg   | val<br>GTG<br>GTG<br>val                 | thr<br>ACC<br>AGC<br>Ser                                |
| leu<br>CTT         | asp<br>GAC                        | AAC<br>AAC<br>asn  | 1ys<br>AAA<br>AAG<br>1ys                 | ile<br>ATC<br>ile                                       |
| leu<br>TTG         | pro<br>000                        | leu<br>TTA<br>TTG  | 91y<br>66C /<br>66C /<br>91y             | ile<br>ATC /<br>ATC /                                   |
| l org              | ala<br>GCC                        | ile l<br>ATT ATC 1   | va)<br>616<br>606<br>81a                 | glu i<br>GAG A<br>GAG A<br>glu i                        |
| net p              | ala a<br>GCA G                    | his i<br>CAC A<br>CAC A<br>his i   | his a                                    | ser 9<br>100 6<br>100 6<br>ser 9                        |
| E <b>«</b>         | 30<br>ser a<br>AGC G              | AAG CGC Property of the proper | ST TE B                                  | 120<br>thr s<br>ACC T<br>GTC T<br>val s                 |
| CAGG               | his s<br>CAC A                    | AAG A A A B B B B B B B B B B B B B B B  | AAG C                                    | gln t<br>CAG A<br>CGG G                                 |
| C16C               | 91y h<br>666 C                    | CTC A GTC A Val 1  | arg l<br>AGA A<br>CGC A<br>arg l         | glu<br>GAG<br>GAG<br>CAG<br>Dlu a                       |
| 7166               | 91y 9<br>666 6                    | ala v<br>600 6<br>600 6<br>9 ala v   |  | 1867<br>1000 0  |
| ACTI               | r n<br>Log                        | n 6 6 6  | alile<br>GATC<br>CCTG                    | u met<br>C ATG<br>C CAA<br>y gln                        |
| CACA               | y ser<br>A TCC                    | val glu<br>6T6 GAA<br>CT6 GAG<br>leu glu   | asn ala<br>AAC GCG<br>ACG GCC<br>thr ala | n leu<br>CTC<br>GGC<br>91y                              |
| ICAC               | 9 9 Jy<br>4 GGA                   |  |  | glu<br>GAC<br>GAC<br>asp                                |
| 1900               | CCA                               | met<br>ATG<br>TTC<br>phe   | leu<br>CTG<br>GTC<br>val                 | asn<br>AAT<br>GCC                                       |
| AAAAGGGCCGTCACCACA | thr                               | glu<br>GAG<br>GAC<br>asp   | TEU<br>CTT<br>ATG                        | met<br>ATG<br>GGC<br>gly                                |
| AAA                | 223<br>233                        | محر<br>555<br>665<br>و1و   | ala<br>606<br>600<br>ala                 | glu<br>GAA<br>CCT<br>pro                                |
| 7                  | 97                                | 187  | 277                                      | 367   |

# Fig. 2B(II)

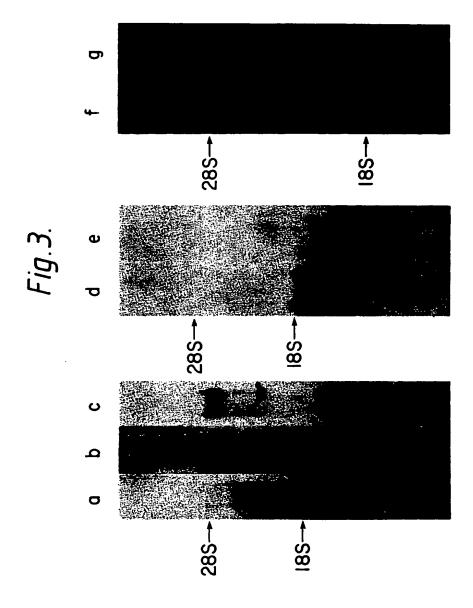
| arg<br>AGG                      | 000<br>000<br>010<br>010   | gln<br>cAG<br>gln               | 91y<br>66c<br>                  | arg<br>CGG<br>arg               |
|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Acc                             | phe<br>TTC<br>GAG<br>glu   | 11e<br>ATC<br>11e               | leu<br>CTG                      | his<br>CAC<br>CAC               |
| arg<br>666                      | 91y<br>66C<br>CAG<br>91n   | ser<br>AGC<br>GCC<br>ala        | Jeu<br>CTG<br>TTT<br>Phe        | ser<br>Ser<br>Ser               |
| asn<br>AAC                      | val<br>GTG<br>TTC<br>phe   | ser<br>AGC<br>GAG<br>glu        | val<br>GTG<br>GTG<br>val        | gln<br>CAG<br>GAG<br>glu        |
| ala<br>600                      | asp<br>GAC<br>TAC<br>tyr   | ser<br>TCC<br>ACC<br>thr        | Jeu<br>CTG<br>Pro               | 91u<br>GAG<br>GAG<br>91u        |
| lys<br>AAG                      | 91u<br>6A6<br>6T6<br>val   | val<br>GTC<br>CTC<br>leu        | ser<br>AGC<br>GTG<br>val        | Tys<br>AAG                      |
| Pro<br>CCC<br>CTG               | ala<br>GCG<br>AAG<br>lys   | 070<br>070<br>070<br>070        | ala<br>GCC<br>GTG<br>val        | 9 lu<br>6A6<br>66C<br>9 l y     |
| val<br>GTC<br>CTG<br>leu        | g lu<br>GAG<br>GTC<br>val  | phe<br>TTC<br>CTC               | 91y<br>66C<br>6CC<br>ala        | glu<br>GAG<br>CCG<br>Pro        |
| 160<br>1ys<br>AAA<br>1ys        | 190<br>glu<br>6A6<br>CG6<br>arg  | 220<br>ile<br>ATC<br>ACC<br>thr | 250<br>thr<br>ACC<br>CTG        | asp<br>GAC<br>GAC<br>GAC<br>asp |
| leu<br>CTG<br>Teu               | 91y<br>666<br>GTT<br>val   | his<br>CAC<br>CAC<br>his        | glu<br>GAG<br>GAG<br>91u        | val<br>GTG<br>GTG<br>val        |
| phe<br>TTC<br>TAC<br>tyr        | ala<br>GCA<br>AAG<br>1ys   | trp<br>166<br>trp               | his<br>CAC<br>CAG<br>91n        | 919                             |
| Jeu<br>CTC<br>Jeu               | asp<br>GAC   | thr<br>Acc<br>GGC<br>9 Jy       | 760<br>760<br>760<br>780        | a]a<br>606                      |
| trp<br>166<br>trp               | ala<br>606   | ser<br>AGC<br>AGC<br>ser        | 91n<br>CAG<br>66C<br>91y        | 91y<br>666                      |
| ile<br>ATC<br>CTG<br>leu        | ser<br>AGC   | AAG CGC                         | glu<br>GAG<br>GAC<br>asp        | 9 Ju<br>6A6<br>                 |
| glu<br>GAA<br>AGT<br>Ser        | 919  | arg<br>CGG<br>AAG<br>1ys        | <u> इन्द्र</u>                  | 91y<br>66A<br>                  |
| ala<br>600<br>600<br>ala        | gln  | ala<br>GCC<br>CTG<br>Teu        | ala<br>GCC<br>CAG               | asp<br>GAC                      |
| arg<br>CGC<br>CAG<br>91n        | 000  | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp        | thr<br>ACT<br>GTG<br>val        | AGG AGG                         |
| 91u<br>6AG<br>6TA<br>val        | 2000 a 20 | val<br>676<br>676<br>val        | arg<br>CGG<br>GAC<br>asp        | lys                             |
| 150<br>val<br>676<br>676<br>val | AGG<br>CGG<br>arg  | 210<br>val<br>676<br>cet<br>arg | 240<br>ile<br>ATC<br>CTG<br>leu | arg<br>A66                      |
| val<br>GTG<br>TTC<br>phe        | gln<br>CAG<br>AGC<br>ser   | lys<br>AAG<br>AAG<br>1ys        | asp<br>GAC<br>AAC<br>asn        | 91y<br>666                      |
| ser<br>TCC<br>CTG<br>Jeu        | 91n<br>CAG<br>66C<br>91y   | 91u<br>6A6<br>6A6<br>91u        | leu<br>CTC<br>leu               | g Ju<br>GAG                     |
| ieu<br>CTG<br>AAC<br>asn        | gln<br>CAA<br>AAG<br>1ys   | ser<br>TCG<br>GTG<br>val        | ala<br>600<br>arg               | a la<br>666                     |
| asp<br>GAC<br>CAG<br>91n        | phe<br>TTT<br>GAG<br>91v   | ile<br>ATT<br>GTG<br>val        | 8er<br>666<br>8rg               | glu<br>GAG                      |
| ser<br>AGT<br>AAC<br>asn        | leu<br>CTC<br>CTG  | leu<br>CTG<br>GAC<br>asp        | lys<br>AAG<br>GAG<br>91u        | 91u<br>6A6                      |
| 91y<br>66C<br>66T<br>91y        | arg<br>CGT<br>GTT<br>val   | val<br>676<br>766<br>trp        | 91y<br>660<br>660<br>91y        | glu<br>6A6                      |
| 91u<br>6AG<br>6AG<br>91u        | ile<br>ATC<br>TAC<br>tyr   | glu<br>GAA<br>CGC<br>arg        | gln<br>CAG<br>CGG<br>arg        | Age                             |
| AAA<br>AAC<br>AAC<br>asn        | ser<br>TCC<br>CCT<br>pro   | ser<br>AGC<br>GAC<br>asp        | asp<br>GAC<br>GAG<br>91u        | AAG                             |
| ser<br>TCC<br>Ser               | val  | 1ys<br>AAG<br>GGC<br>91y        | TTT phe                         | lys lys lys<br>AAG AAG AAG      |
|                                 | 170<br>AAA   | 200<br>glu<br>GAG<br>CAC        | 230<br>1eu<br>1eu               | AAG                             |
| glu<br>GAG<br>TTC<br>phe        | ACC  | 91u<br>6A6<br>66C<br>91y        | arg<br>CGC<br>GCC<br>ala        | AAG                             |
| 448                             | 538  | 628                             | 718                             | 808                             |

## Fia. 2B(III)

|   |  |   |   |  | levest  |
|---|--|---|---|--|---|
|   | ile<br>ATC<br>CTC  | 25 E S  | 91y<br>660<br>91y                             | 11e<br>ATC<br>11e  | ACG(  |
|   | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn   | tyr<br>TAC<br>TAC<br>tyr  | 2 arg<br>2 cc<br>2 cc<br>2 arg                | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn   | 2299  |
|   | val<br>GTC<br>ACC<br>thr   | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn  | met<br>ATG<br>met                             | gln<br>CAG<br>TAC  | C66C<br>AT66  |
|   | lys<br>AAG<br>CGG<br>arg   | ala<br>660<br>666<br>91y  | 250<br>000<br>000<br>000<br>000<br>000<br>000 | 91y<br>666<br>6A6<br>91u   | ACGA  |
|   | 91y<br>560<br>91y  | his<br>CAC<br>TAT<br>tyr  | tyr<br>tyr                                    | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp   | 9999  |
|   | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp   | Juit<br>TAC<br>Tyr<br>tyr   | his<br>CAC<br>CAG<br>91n                      | asp<br>GAC<br>GAT<br>asp   | SCCC  |
|   | 4557 S   | Subunit<br>gly tyr<br>GGC TAC<br>GGC TAC<br>gly tyr                                 | asn<br>AAC<br>asn                             | tyr<br>TAC<br>TTC  | 9999  |
|   | leu glu cys asp<br>CTG GAG TGT GAC<br>CTG GAG TGT GAC<br>Teu glu cys asp | Ser ser TCC ACC thr   | ile<br>ATC<br>GTC<br>val                      | t Ac<br>t yr   |   |
|   | Teu CTG CTG CTG  | Pro ser CCC ACC ACC Pro thr   | 370<br>val<br>GTC<br>GTG<br>val               | 400<br>CTG<br>CTC  | )<br>(CT6)  |
|   |  | ala<br>6CT<br>6CG<br>ala  | thr<br>ACG<br>GCC<br>ala                      | met<br>ATG (   | 0000  |
|   | argigiy leu<br>CGG GGC CTG<br>CGG GGC CTG<br>argigiy leu                 | ile a   | ser 1<br>TCG /<br>ACG (                       | Ser n  | 0000<br>0000  |
|   | arg<br>666<br>846<br>1ys   | fle<br>ATC /<br>ATC /<br>ile  | his CAC                                       | met<br>ATG<br>met  | AGCGCCGGCCGGGGCCCGGGGCCCGGGGACGACGGCGGCACGC<br>AAGCATGGGCTCGGGACTGTCCCTGCGGGCACGGGGGGGG |
|   | 6000 E   | trp<br>166<br>trp   | phe TTC O                                     | thr (  | Age   |
|   | arg                                  | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp  | ser<br>TCC<br>Ser                             | AGG (AGC /   | AM<br>TAG<br>TGA<br>OP  |
|   | arg<br>CGC<br>CGC<br>arg   | asn<br>AAC<br>AGT<br>ser  | TCA Ser                                       | 288 a  | 24<br>5555 E  |
| ١ | pro his  | 156<br>156<br>179   | ser<br>TCG<br>GCC<br>ala                      | lys<br>AAG<br>1ys  | 82528   |
| • | 23 l   | 919<br>966<br>979<br>919  | 367<br>700<br>8er                             | thr<br>thr   | 917<br>966<br>719   |
|   | his<br>CAC<br>AGG<br>arg   | ile<br>ATC<br>ATT   | 91y<br>660<br>660<br>91y                      | 500 g  | 25 TE 25  |
|   | 300<br>glu<br>GAG<br>AGC   | 330<br>asp<br>GAC<br>CTC  | 360<br>TCG<br>CCA<br>pro                      | 390<br>Figs val<br>Figs GTC<br>Figs ATC                          | 420<br>glu Cys gly Cys s<br>6A6 TGC 666 TGC<br>6A6 TGT 667 761 6<br>glu Cys gly Cys a   |
|   | g lu<br>GAA<br>GAC<br>as p   | lys<br>AAG<br>CGC<br>arg  | thr<br>ACG<br>GTG<br>val                      |  | glu<br>GAG<br>GAG<br>glu  |
|   | ser<br>TCC<br>GGT<br>gly   | phe<br>TTC<br>phe   | gly thr<br>GGC ACG<br>GGC GTG<br>gly val      | \$ 446<br>\$ 5 4 465<br>\$ 5 4 4 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 | val<br>GTG<br>GTG<br>val  |
|   | gln<br>CAG<br>CTG  | ser<br>AGT<br>GAC<br>asp  | ala<br>606<br>607<br>ala                      | ser<br>100<br>100<br>ser   | ile<br>ATC<br>ATC   |
|   | arg<br>CGC<br>CGA<br>arg   | val<br>GTC<br>ATC<br>ile  | ile<br>ATA<br>CTG                             | 1ys<br>AAG<br>AAC<br>asn   | met<br>ATG<br>ATG<br>met  |
|   | ala<br>600<br>ala  | phe<br>TTC<br>TTC<br>phe  | his<br>CAC<br>TAC<br>tyr                      | leu<br>CTC<br>GTG<br>val   | AAC<br>AAC<br>asn   |
|   | 5885   | 통도도 중   | ser<br>AGC<br>GCC<br>ala                      | NCA<br>Chr   | gln asn<br>CAG AAC<br>CCC AAC<br>pro asn  |
|   | leu<br>CTG<br>GTG<br>val   | 2 S S 5 - 6   | 5225  | ala<br>600<br>660<br>91y   | TC<br>TG  |
|   | met<br>ATG<br>GTG<br>val   | AAG<br>CAA<br>91n   | 52ES  | Phe TTC  | asp<br>asp  |
|   | leu<br>CTC<br>GTG  | lys<br>AAG<br>AGG<br>arg  | glu<br>GAG<br>AGC<br>Ser                      | 500 F  | lys<br>AAG<br>CGG   |
|   | 290<br>TTC<br>TTC<br>Phe   | 320<br>cys lys lys gln p<br>rec Ade Ade Cae<br>Tec Ade CAe Cae<br>Cys arg gln gln p | 350<br>91y<br>91y<br>91y                      | 380<br>ser pro<br>AGC CCC<br>AAC CCG                             | 410<br>R 1ys 1ys asp i<br>AAG GAG GAC G<br>1 1ys arg asp v                              |
|   | 500 g  | 25.<br>25.<br>25.<br>25.  | glu<br>GAG<br>GAG<br>9 lu                     | his<br>CAC<br>CTG<br>leu   | ile<br>ATC<br>GTC<br>val  |
|   | 868  | 888   | 1078  | 1168   | 1258  |
|   | ~  | <b>J</b> .  | 7   | 11   | 71  |

# Fig.2B(I<u>V</u>)

- GTGGTCTTGCCGCTGGGTGGCCCGGCAGGTGCCAGGGTGGGAGGCCTGAGATACTTTCCTACTTTTTGAGCAATCAGTCGAAACCAGAGGGCGGACCCTCCGTGGACACGAAAGA 1360
- 1480
- 1600
- 1720



## Fig.4A.

GLE---CDGKVNI-CCKKOFFVSF-KDIGWNDWIIAPSGY ALDTNYCFSSTEKNCCVROLYIDFRKDLGWK-WIHEPKGY GLE---COGRINI-CROOFFIDFRI-ICWSDWIIAPTGY p.BA-Inh: p.BB-Inh: h.B -TGF:

HANY CEGECPSHIAGTSGSSLSFHSTYINHYRMRGHSPFA HANFCLGPCPYIWSLDT----QYSKVLAL-YNQ--HNPGA YGNYGEGSEPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGp.BA-Inh: h.B-TGF: p.BB-Inh:

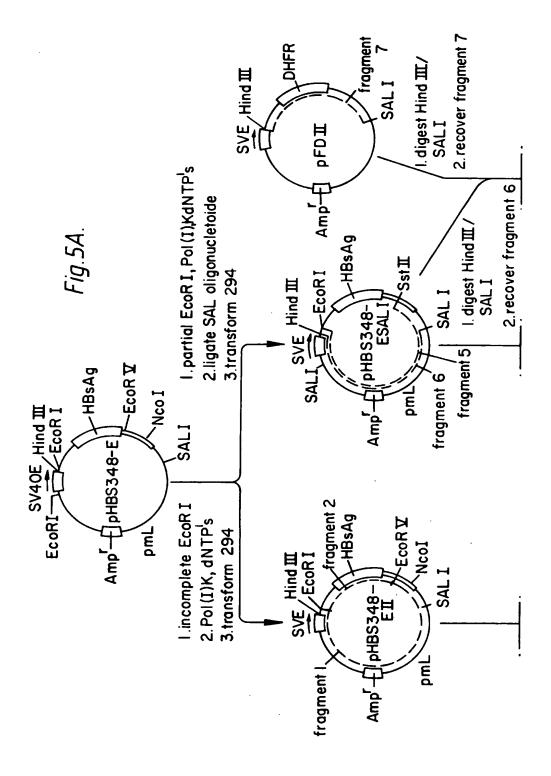
NLKSCOVPTKLRPMSMLYYDDGQNIIKKDIQNMIVEEGGGS SAAPCOVPQALEPLPIVYYV-GRKPKVEQLSNMIVRSCKCS TVNSCOTPTKLSTMSMLMFDDEYNIVKRDVPNMIVEECG p. B. A -Inh: p.BB-Inh: h.B-TGF:

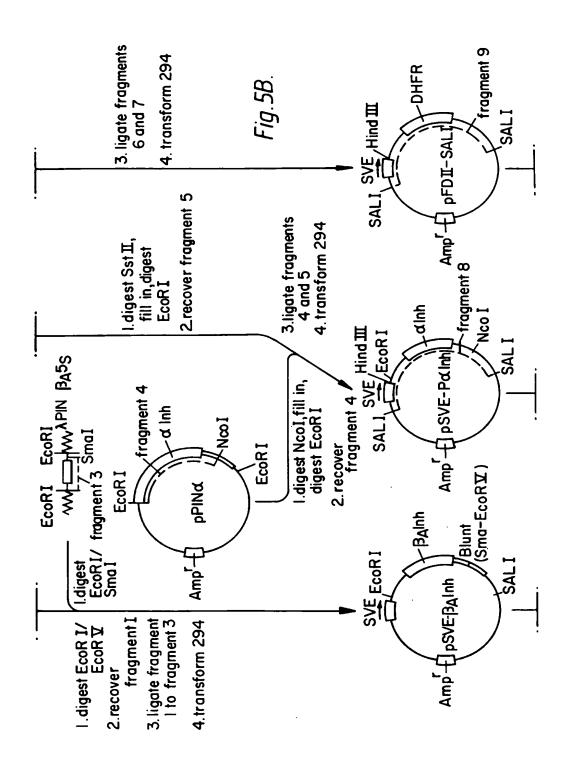
# Fig.4B.

GLECDGKWNI-CKKQFFVSFKDIGWNDWIJAPSGYHANYI RPPEEPAVHADOHRASLNISFOELGWDRWIVHPPSFIFHY <u>ත</u> p. BA-Inh p. a - Inh:

EGEGEEPSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYRMRGHSPFANLKS CHGGEGLPTLPNLPLSVPGAPPTPVQPLLLVPGAQ---P p.BA-Inh: p. & - Inh:

II6 CONTKLRPMSMLYY -- DDGQ-NIIKKDIQNMIVEEGGGS CAALPGTMRSLRVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHGAGI 35 p.BA-Inh p. & -Inh:





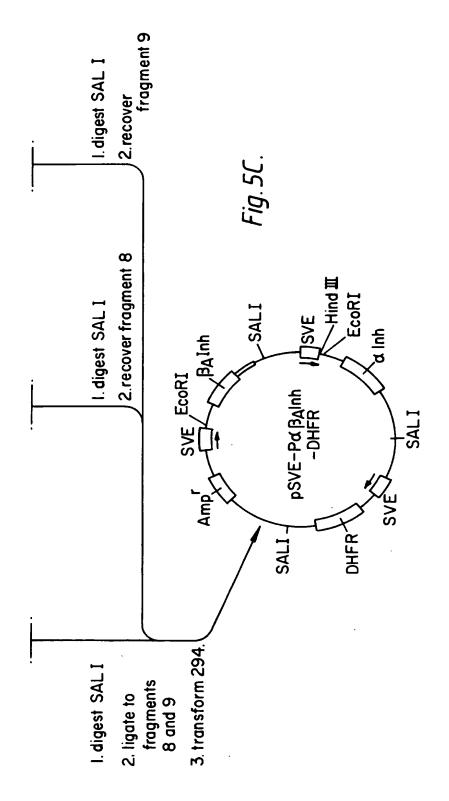


Fig.6A.

Asp GAT Thr A la GCT Leu CTG Leu CTG Met ATG Phe TTC Ala GCC Leu TTG Ala Asp GAC Tyr TAC Va) GTG Leu CTG <del>ر</del> 23 Phe TTC His CAT Leu CTG SS SA Arg AGA ಕ್ಟ Ser TCT Thr ACG Leu CTG 30 Arg AGA Phe TC Phe 777 61*y* 666 130 61*y* 66*A* 180 Ala GCC Leu CT Ala GCC Arg CGA Leu CT CTC Thr Acc 61*y* Ala GCT GAG GAG Arg AGG Pro CCC 11e ATC His 61*y* 5 5 5 5 5 Ser TCT Pro CCT Val GTG Phe TTC Leu CTG Ala GCC GJu GAG Ser TCA Thr ACC Arg CGG Arg CGG GA SI GJu GAG Tr 55 Leu CTG Lys Agg Ala GCC Ala GCC Arg AGG Ala GCT -1 Ala GCC Ser TCC 100 Leu CTG Ala GCA 150 Leu CTG Ser TCA Glu GAG Cee C16 Ala Gln GCC CAG Leu C76 Val GTC Val GTC His CAC Ala Arg Glu Leu Val GCC CGG GAA CTT GTT Asp GAT GAG CAG 61*y* Cie Cie Ce CTG Glu GAG Ala GCC 7 55 Ser TCA Val GTG 61y 660 Gln Val Thr S CAG GTG ACT Leu CTC Asp GAC Ga GAG Leu CTG Ala GCC Leu CTA 20 61,5 66,6 GAA GAA 5 613 666 120 Leu CTG Tro TGG 57 57 53 61*y* 66T GJu GAG Arg AGA క్రా His CAC Cys TGT Glu Leu GAG CTG Ala GCC Arg GJu GAG Pro CCT GAA GAA £23 Arg CGC 90 r Gln His Thr Arg Ser A c CAG CAT ACA CGC AGC C 140 His Ala Pro F CAT GCT CCC ( Asn Ser Ser ( Arg AGG GJu GAG Ala GCT Leu CTG -10 Leu CTG Thr ACC Ser TCT Ser TCA Le C3 61y 666 Lys Ag Val GTG 61y 660 Leu CTG GJn CAG Arg AGG Ala GCG Asp GAC Ser TCC 61*y* · Val GTG **2**23 His CAC Glu GAG Ser AGC Ala GCC Leu TTG Leu CTG 85 P 533 Ser TCC Ala GCA Ser AGC AG Th Ser TCT Val GTC 61*y* Val GTC Phe TTC Ser AGC S S S **2**23 ACA Met ATG -16 613 666 60 A la GCC 15 15 17 17 17 61*y* Arg 110 61y 66C **5**23 160 His Asp GAT Gln CAG Ala GCC 61*y* Phe TTC Val GTG Thr ACC G 75 150 225 375 8 150

Fig.6B.

335 (C) II OC\* 1050 (C) GGTGGGGGGTCTTCCTTCTTAATCCCATGGCTGGTGGCCACGCCCCCACCATCATCAGCTGGGAGGAAAGGCAGAGTTGGGAAATA His CAC క్షి Ala GCT His CAT His CAC <u>\$5</u> Phe TTC CA ACC Val Ala Leu Asn Ile Ser Phe Gln Glu Leu Gly Trp Glu Arg Trp Ile Val Tyr Pro Pro Ser Phe Ile GTA GCA CTG AAC ATC TCC TTC CAG GAG CTG GGC TGG GAA CGG TGG ATC GTG TAC CCT CCC AGT TTC ATC 330 Gln His CAG CAC a subunit Pro CCT <del>ر</del> م دری Ala Asn GCC AAC Met Arg ATG AGG 88 c 23 Ala GCT Thr ACG 210 Pro Trp Ser Pro Ser Ala Leu Arg Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His 675 CCT TGG TCT CCC TCT GCT CTG CGC CTG CGG AGG CCT CCG GAG GAA CCG GCT GCC CAT Pro 61y / CCT 666 ( Thr Leu CTC Pro Gly CCA GGG Leu CTT 61y Leu His Ile Pro Pro Asn Leu Ser Leu Pro Val Asn 320 Lys Tyr Glu Thr Val Pro AAG TAT GAG ACA GTG CCC CE 30 Ala GCT Ala GCT Ala Gln Pro Cys Cys GCC CAG CCC TGC TRT Gly Gly Tyr Ser Phe GGA GGT TAC TCT TTC 290 Leu Pro Gly A CTG CCA GGG G Pro Tyr Ser Leu CCC TAC TCC TTG 310 Val Arg Thr Thr Ser Asp GTC CGC ACC ACC TCG GAT His Gly Gly Cys Ala Gln I GCC CAG 885 Leu CTG TAC 909 750 825 900

## Fig. 74.

| -30<br>MWPQLLLLLLAPRSGHGCQGPELDRELVLAKVRALFLDALGPPAVTGEGG<br>GVSSQGLELARELVLAKVRALFLDALGPPAVTREGG<br>*** * * * | 40 DPGVRRLPRRHAVGGFMRRGSEPEEE-DVSQAILFPATGARCGDEPAAGE DPGVRRLPRRHALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARG | 100<br>LAREAEEGLFTYVFRPSQHTHSRQVTSAQLWFHTGLDRQGMAAANSSGPL<br>LAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPL | 120<br>LDLLALSSRGPVAVPMSLGQAPPRWAVLHLAASALPLLTHPVLVLLLRCP<br>LGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCP<br>* * * * |
|--|--|---|--|
| pin. alpha   | pin.alpha  | pin.alpha   | pin.alpha  |
| hin. alpha   | hin.alpha  | hin.alpha   | hin.alpha  |

## Fig. 7B.

| 200<br>LCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERARRSTAPLP-WPWSPAALRLLQ<br>LCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERARRST-PLMSWPWSPSALRLLQ<br>* ** ** | 220<br>RPPEEPAVHADCHRASLNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLPTL<br>RPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLHIP | 280 PNLPLSVPGAPPTPVQPLLLVPGAQPCCAALPGTMRSLRVRTTSDGGYSF PNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSF * * * * * * * | 320<br>KYETVPNLLTQHCACI<br>KYETVPNLLTQHCACI |
|--|---|---|---|
| pin. alpha   | pin.alpha   | pin.alpha   | pin.alpha                                   |
| hin. alpha   | hin.alpha   | hin.alpha   | hin.alpha                                   |

## Fig.8A.

 -20 Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp sccagg ATG CCC TTG CTT TGG CTG AGA GGA TTT CTG TTG GCA AGT TGC TGG

**TTTAAAAAGGCAATCACAACAACTTTTGCTGCCAGG** 

Leu CTG 282

Met ATG 20 Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn GCC CTC CCA AAG GAT GTA CCC AAC TCT CAG CCA GAG ATG GTG GAG GCC GTC AAG AAG CAC ATT TTA AAC Ala 600 357

JE CH 40 Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys Ala Ala Leu Leu Han Ala Ile Arg Lys TTG AAG AAG AGA CCC GAT GTC ACC CAG CCG GTA CCC AAG GCG GCG CTT CTG AAC GCG ATC AGA AAG His CAC Leu CTG 432

Asn AAT 70 Gly Lys Val Gly Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu Met GGC AAA GTC GGG GAG AAC GGG TAT GTG GAG ATA GAG GAT GAC ATT GGA AGG AGG GCA GAA ATG Val GTG A His 507

90 Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile GAG CAG ACC TCG GAG ATC ATC ACG TTT GCC GAG TCA GGA ACA GCC AGG AAG ACG CTG CAC TTC GAG ATT Met ATG 35 582

### Fia.8B

| Asn               | Glu                | Lys               | Val               | G1 u              | Arg                       |
|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|                   | GAA                | AAG               | GTT               | GAG               | AGA                       |
| Ala<br>GCC        | <b>61</b> y<br>666 | Arg               | Asp<br>GAC        | G1u<br>GAA        | His                       |
| Lys<br>AAG        | 160<br>Thr<br>ACA  | Ala<br>GCT        | 210<br>Leu<br>CTG | Lys<br>AAA        | 260<br>Ser<br>TCG         |
| Pro               | Asp                | Asp               | Ser               | Lys               | G]n                       |
| CCC               | GAC                | GAC               | TCC               |                   | CAG                       |
| Val               | Leu                | Val               | Ser               | Lys               | G1u                       |
| GTC               | TTG                | GTA               |                   | AAG               | GAG                       |
| Lys               | Ser                | Val               | Lys               | Lys               | Lys                       |
|                   | AGC                | GTA               | AAG               | AAG               | AAG                       |
| Leu               | 61y<br>660         | Lys               | 61y<br>660        | L'ys<br>AAG       | G1u<br>GAA                |
| 130<br>Phe<br>TTC | G1n<br>CAG         | 180<br>G1u<br>GAA | Gln<br>CAG        | 230<br>61y<br>660 | G1u<br>GAG                |
| Leu               | Pro                | Ser               | Asp               | Leu               | Asp                       |
|                   | CCG                | TCT               | GAC               | CTG               | GAT                       |
| Trp<br>TGG        | His                | Leu               | Leu<br>CTG        | Leu               | Ala<br>GCA                |
| Va l              | Lys                | Leu               | Leu               | Val               | 61 <i>y</i>               |
| GTC               | AAG                | TTG               | TTG               | GTT               | 66A                       |
| GAA               | Gln                | Leu               | Arg               | Leu               | Ala                       |
| GAA               | CAG                | CTG               | CGG               | TTG               | GCA                       |
| Ala<br>GCA        | 150<br>Gln<br>CAG  | G1u<br>GAA        | 200<br>Gln<br>CAG | Ser<br>AGC        | 250<br>61 <i>y</i><br>666 |
| Arg               | Gln                | Ser               | I 1e              | Ala               | 61y                       |
|                   | CAG                | AGT               | ATC               | GCC               | 66T                       |
| 61u               | Phe                | Arg               | Ser               | 61 <i>y</i>       | G1u                       |
| 6A6               | TTC                | AGG               | AGC               | 660               | GAA                       |
| Val               | Leu                | G1u               | Ser               | Ser               | 61 <i>y</i>               |
| GTG               |                    | GAG               | AGC               | AGT               | 66T                       |
| Val               | Arg                | 61 <i>y</i>       | Ser               | G1u               | 61 <i>y</i>               |
| GTG               |                    | 666               | TCC               | GAG               | 66A                       |
| 120<br>Ser<br>TCA | I 1e<br>ATC        | 170<br>Lys<br>AAG | Val<br>GTC        | 220<br>G1n<br>CAG | 61 <i>y</i><br>660        |
| Leu<br>CTG        | Thr                | Leu<br>TTA        | Pro<br>CCT        | 2.C               | Lys                       |
| Asp               | Val                | 61 <i>y</i>       | Phe               | Gln               | Lys                       |
| GAC               | GTC                | 660               | TTC               | CAG               | AAG                       |
| Ser               | Lys                | Val               | Val               | GJu               | Lys                       |
| AGT               | AAA                | GTG               | GTC               | GAG               |                           |
| 61y               | Thr<br>ACC         | G1u<br>GAA        | His               | 167               | 61 <i>y</i><br>666        |
| G1u<br>GAA        | 140<br>Arg<br>AGG  | G1u<br>GAG        | 190<br>Trp<br>TGG | Ala<br>GCC        | 240<br>G1u<br>GAA         |
| Lys<br>AAG        | Thr                | Ala<br>GCC        | Thr               | I 1e<br>ATT       | 61 <i>y</i><br>666        |
| Ser               | Arg Thr            | Glu               | Ser               | Arg               | G1u                       |
| TCC               | AGG ACC            | GAG               | AGC               |                   | GAG                       |
| 657               | 732                | 807               | 882               | 957               | 1032                      |
|                   |                    |                   |                   |                   | -                         |

Fig.8C.

His Arg Arg Arg 61y Leu 61u Cys Asp CAT CGC CGG CGT CGG CGG GGC TTG GAG TGT GAT 350 Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe Ala Asn Leu Lys Ser Eys CGC ATG CGG GGC CAT AGC CCC TTT GCC AAC CTC AAA TCG TGG 310 Lys Asp Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile AAG GAC ATC GGC TGG AAT GAC TGG ATC ATT 320 Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser CCC TCT GGC TAT CAT GCC AAC TAC TRE GAG GGT GAG TEC CCG AGC CAT ATA GCA GGC ACG TCC GGG TCC Asp GAC 380 / Gln Asn Ile Ile Lys L F CAA AAC ATC ATC AAA A 370 Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly G GTG CCC ACC AAG CTG AGA CCC ATG TCC ATG TTG TAC TAT GAT GAT GGT Phe TTC 270 Phe Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro TTC CTC ATG CTG CAG GCC CGG CAG TCT GAA GAC CAC CCT Ser Lys Val Asn Ile Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val AAG GTC AAC ATC TOTO TOTO AAA CAG TTC TTT GTC 340 Ser Phe His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr TCC TTC CAC TCA ACA GTC ATC AAC CAC TAC Pro CCT 61*y* 1407 TGT Ala GCT Leu CTG 1332 1107 1257

1570 GCAAAATGAAGAAATTTTTAAGGTTTCTGAGTTAACCAGAAAAATAGAAATTAAAAACAAAACA polya

Fig.9A.

30 Val GTG Met ATG 85. 85. 85. 130 Leu CTG Thr ACC Ala GCG Ala GCC Leu CTC Ser AGC **T**57 Ga GAG Ala GCC Ala GCC Leu Cic 63 660 Val GTG 7.7 5.8 50 Val Pro Lys / : GTG CCT AAG ( Leu CTG His Asp GAT GJn CAG ₿Ş Phe TTC 5 2 3 3 Thr ACA Val GTC Val GTC Ser AGC Gly Asp GGC GAC Glu Ile GAG ATC 100 Glu GAG Val GTG 150 Arg CGG Arg CGC His Ala CAC GCC Ala GCC Lys AAG Phe TTT Va) GTG Asp GAC Val GTG Phe TTC Leu CTG Lys Agg Leu CTC 20 u Glu Leu Gly Arg Val A s GAG CTC GGC CGA GTG G Pro Asn Ile Thr H Arg Arg CGG CGG Arg CGC Asn AAC Ser AGC Asp GAC cAG. 61*y* 660 Ile ATC Val GTG Asp GAC Ile ATC 120 Asn AAC Ser AGC 170 Arg AGG GJu GAG Glu GAA 63 660 61*y* 660 Lys AAG Gly Arg GGC CGG Arg CGC GJu GAA Ser TCC Lys Ag GJu GAG GJu GAG Asn AAC Val GTG Val GTT Glu GAG Val GTG S S Arg CGG Ag Ag Arg Ser TCC Ge Ge Met ATG Phe Arg Arg F 40 Met ATG 63.y 66.C 63u 646 Ile ATC 140 Val GTC Asn GJr CAG Ala GCG G]n CAG Phe TTC Tyr TAC Tr 56 Leu CTG His 63 63 63 Phe TC <del>2</del> 23 Arg AGG 10 Ser Cys 61y 61y F TCG 160 66C 66C 1 Arg Leu CTG Asp GAC Tyc Leu CTG Asp Ser AGC Lys Ag Ala GCC Leu CTA Cie Cie 61y 66T 16 13 13 8 8 8 8 9 61*y* 660 110 Arg 660 ₽ŞŞ 160 His CAC Ile ATC Leu CTG <del>წ</del> ე Val GTC Se Ge 61*y* Cys Thr TGT ACG His Ala GCC Arg CGG Ser AGC Tyr TAC G G G Arg CGG Ala GCC Thr ACG Ser ZE CHE Lys AAG Va) GTC His CAC Ser TCC 7.7 55 g Reg ຽ 150 75 225 450 38

Met ATG

**5**33

Val GTG

Asp GAC

Arg CGG

Lys AAG

Val GTC

I 1e ATC

Asn

Tyr TAC

Asp GAT

Asp GAT

Phe TC

Tyr TAC

Leu C7G

Met ATG

Ser TCC

Met ATG

Thr

340 G1u GAG

350 Asn AAC

# Fig.9B

230 Val 6TG Cys 280 Tyr TAC Ala GCT 330 Ser AGC Pro Val Phe Val Asp Pro Gly Glu Glu Ser His Arg Pro Phe Val Val Val CCG GTG TTC GTG GAC CCA GGC GAA GAG TCG CAC CGG CCC TTT GTG GTG GTG TTC GTG GAC GAG GAG GAG TGG GAT GGC GGG ACC AAC CTC AAC CTG GAG GAT GGC CGG ACC AAC CTC Val Gln Cys / Tyr TAC Thr ACG Le CG **61** 660 His Rys Ags Phe TTC ACC ACC Thr Cys Cys 11e Pro 1 Asp GAC ال 200 Ser TCC 200 Leu Asn Leu / CTC'AAC CTA ( Ala GCA 300 Ser TCC Ser Ala TCT GCC Ile ATA 11e ATC Pro 61y CCC 66C Asn Ser AAC TCC Arg CGA <u>다</u> 35 Arg CGG Asp GAC Gly Glu GGC GAG Val GTC 270 Asn AAC 320 Val GTG T 58 61*y* 666 Thr. Glu Arg 61y 660 Ala 6CA 61y 66C Ile ATC **2** 23 Leu CTG 190 Gln Ala Leu Phe G CAG GCC TTG TTT 6 Le CTC Asn AAC Z Z S Gly Leu GGT CTG Arg CGC 290 Ala GCC SCA SCA Phe TTC Ala Val Val 6 GCC GTG GTG 0 61u 61y Ser Cys P GAG GGC AGC THC Arg AGG Asp GAC Arg CGG Ala Ile GCC ATC Arg Met CGC ATG Ile ATT Ser AGC Phe TC Asp GAC G]u GAG 61y 66C 210 Leu CTG 260 Phe TTC 350 TAC TAC Thr ACG GAG GAG 89 Gln CAG Leu CTG GJn CAG Leu CTC Gln CAG Arg GA S Tyc Asn క్షిక్త C.ys TGC Ala GCT Arg AGG Asn Val GTG Phe TTC Ser AGC G S S 88 61*y* Val GTG 525 9 675 750 8

# Fia.9C.

359 CONTROL CONTROL OF A CAGTGCAAGGCAGGGGCACGGTGGTGGGGGCACGGGGCAGTCCCGGGGTGGGCTTCTTCCAGCCCCGCGGGGAACGGGGT 1145 ACACGGTGGGCTGAGTACAGTCATTCTGTTGGGCTGTGGAGATAGTGCCAGGGTGCGGCCTGAGATATTTTTCTACAGCTTCATAGAGCAACCAGTCAAA 1345 TACCAGCAAATGGATGCGGTGACAAATGGCAGCTTAGCTACAAATGCCTGTCAGTCGGAGAGAATGGGGTGAGCAGCCACCCATTCCACCAGCTGGCCGG CGTGCTTCAAGGCCTGGGGAGCCTGTCCTTCCATGCCCTTGTCGAGGGAAAGAGACCCAGAAAGGACACAACCCGTCAGAGACCTGGGAGCAGGGGCAAT TTGTTCTAAATGAAAGAAAA 1645 1745 1845 1945

(11) EP 0 222 491 B2

(12)

#### **NEW EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

- (45) Date of publication and mention of the opposition decision:13.08.2003 Bulletin 2003/33
- (45) Mention of the grant of the patent: 15.03.1995 Bulletin 1995/11
- (21) Application number: 86307586.7
- (22) Date of filing: 02.10.1986

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/16**, C07K 14/575, C12P 21/02, A61K 38/22, A61K 39/395

# (54) Nucleic acid encoding the alpha or beta chains of inhibin and method for synthesizing polypeptides using such nucleic acid

Die alpha- oder beta-Ketten von Inhibin codierende Nukleinsäure und Verfahren zur Synthese von Polypeptiden unter Verwendung einer solchen Nukleinsäure

Acide nucléique codant les chaînes alpha ou bêta d'inhibine et méthode de synthèse de polypeptides par utilisation d'un tel acide nucléique

- (84) Designated Contracting States:
  AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE
- (30) Priority: 03.10.1985 US 783910 07.02.1986 US 827710 12.09.1986 US 906729
- (43) Date of publication of application: 20.05.1987 Bulletin 1987/21
- (73) Proprietor: GENENTECH, INC. South San Francisco California 94080 (US)
- (72) Inventors:
  - Mason, Anthony John
     San Francisco California 94122 (US)
  - Seeburg,Peter Horst 69 Heidelberg (DE)
- (74) Representative: Stuart, Ian Alexander et al MEWBURN ELLIS York House 23 Kingsway London WC2B 6HP (GB)

- (56) References cited: WO-A-86/00078
- WO-A-86/06076
- Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 129 (1985), pages 396-403, K. Miyamoto
- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 83, no.16, August 1986, Baltimore, USA; K.E. MAYO et al., pages 5849-5853
- NATURE, vol. 318, 19/26 Dec. 1985, New York, London; A.J. MASON et al, pages 659-663
- NATURE, vol. 321, 19 June 1986, New York, London; W. VALE et al., pages 776-779
- NATURE, vol. 321, 19 June 1986, New York, London, N.LING et al., pages 779-782
- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, no. 12, June 1985, Baltimore, USA; C.H.LI et al., pages 4041-4044
- FEBS LETTERS, vol. 175, no. 2, October 1984, Amsterdam; N.G. SEIDAH et al., pages 349-355

EP 0 222 491 B2

#### Description

#### **BACKGROUND**

[0001] This invention relates to methods for making proteins in recombinant cell culture which contain the α or β chains of inhibin. In particular, it relates to methods for obtaining and using DNA which encodes inhibin, and for making inhibin variants that depart from the amino acid sequence of natural animal or human inhibins and the naturally-occurring alleles thereof.

[0002] Inhibin is a protein produced in the gonad which acts specifically at the pituitary level to inhibit the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH). The existence of inhibin was first postulated by McCullagh in 1932 ("Science" 76: 19-20). Such preferential regulation of the gonadotropin secretion has generated a great deal of interest and has prompted many laboratories in the past fifty years to attempt to isolate and characterize this substance from extracts of testis, spermatozoa, rete testis fluid, seminal plasma and ovarian follicular fluid, using various bioassays. Although many reports have appeared in the literature claiming the purification of inhibin-like material with molecular weights ranging from 5,000 to 100,000 daltons, subsequent studies have shown that these substances were not homogenous, did not have the high specific activity expected of true inhibin and/or failed to exhibit the molecular characteristics of inhibin as described herein (de Jong, Inhibin-Factor Artifact, "Molecular & Cellular Endocrin." 13: 1-10 (1979); Sheth et al., 1984, "F.E.B.S." 165(1) 11-15; Seidah et al., 1984, "F.E.B.S." 175(2):349-355; Lilja et al., March 1985, "F.E.B.S." 182(1):181-184: Li et al., June 1985, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 82:4041-4044; Seidah et al., "F.E.B.S." 167(1): 98-102; and Beksac et al., 1984, "Intern. J. Andrology" 7:389-397).

[0003] A polypeptide having inhibin activity was purified from bovine or ovine follicular fluid (PCT 86/00078, published January 3, 1986). This protein was reported to have a molecular weight of 56,000±1,000 on SDS-PAGE and was dissociable into two subunits having apparent molecular weights of 44,000±3,000 and 14,000±2,000. Amino terminal sequences for each subunit were described.

[0004] Miyamoto, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 129(2), 1985, 396-403 disclose isolation of at least four inhibin-like proteins from porcine follicular fluid. One of Mr 32K was further separated into bands I, II and III. Band II was reduced and dissociated into two bands of Mr 20K and 13K having N-terminal sequences Ser-Thr-Ala-Pro and Gly-Leu-Glu-Cys respectively.

[0005] EP-A-210 461 (Ajinomoto) which is part of the state of the art by virtue of Art 54(3)EPC discloses isolation of a polypeptide from malignant human monocytic cells. The polypeptide had a molecular weight of 25±1KD under non-reducing, and 16±1KD under reducing SDS electrophoresis. The amino terminal sequence and that of a cyanogen bromide cleavage fragment of the 16KD polypeptide were determined.

[0006] WO86/06076 (Biotechnology Australia) which is part of the state of the art by virtue of Art. 54(3)EPC discloses DNA sequences encoding inhibin.

[0007] Two proteins both having a molecular weight of about 32,000 daltons and having inhibin activity have been successfully isolated from porcine follicular fluid. Purification of porcine inhibin to substantial homogeneity, ie. about 90% by weight of total protein in the fraction, was achieved through a combination of protein separation procedures including heparin-Sepharose affinity chromatography, gel filtration and reverse-phase, high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

[0008] These proteins were isolated to substantial homogeneity from material obtained from swine and are referred to as Protein A and Protein B. Each protein has a molecular weight of about 32,000 daltons (32K) and is composed of two polypeptide chains having molecular weights of 18,000 and 14,000 daltons, respectively, the chains being linked together in the hormonally-active protein by disulfide bonding. The amino-terminal amino acid residue sequence of the 18,000 daltons (18K) or alpha chain of both proteins was determined to be

Ser-Thr-Ala-Pro-Leu-Pro-Trp-

Pro-Trp-Ser-Pro-Ala-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Pro-Glu-Glu-Pro-Ala-Val,

[0009] The amino-terminal amino acid residue sequence of the 14,000 dalton (14K) or beta chain of Protein A was determined to be

55

45

and of Protein B was determined to be

Leu-X-X-Arg-Gln-Gln-Phe-Phe-Ile-Asp-Phe-Arg-Leu.

[0010] Proteins A and B have been completely characterized. Each 32K protein exhibits inhibin activity in that it specifically inhibits the basal secretion of FSH but does not inhibit secretion of luteinizing hormone (LH). The individual chains were not hormonally-active.

[0011] After the filing of the parent application hereto, inhibin B-chain dimers were shown to exist in follicular fluid as naturally-occurring substances, termed activin, which are capable of stimulating FSH release by rat anterior pituitary cells (Vale et al., 1986, "Nature" 321:776-779 and Ling et al., 1986, "Nature" 321:779-782).

[0012] The amino acid sequence of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin from humans remained unknown until the invention herein. The large quantities of human follicular fluid required to parallel the studies conducted with animal inhibins are not readily available, nor is there any assurance that human and animal inhibins would be sufficiently similar that purification using a parallel procedure would be effective. Accordingly, methods are needed for determining the characteristics and amino acid sequence for human inhibin.

[0013] Also needed are economical methods for making the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin in large quantities, preferably entirely and completely free of proteins from the species homologous to the inhibin in question, which inhibin preferably also is biologically active.

[0014] These and other objects will be apparent from consideration of the invention as a whole. The scope of protection is as determined by the appended claims. Subject to that, the following represents a description of the invention.

#### **SUMMARY**

5

10

15

30

55

[0015] Nucleic acid now has been isolated and cloned in replicable vectors which encodes the mature porcine and human a and chains of inhibin and their precursor prepro and pro forms. Sequencing of inhibin-encoding cDNA has led to the identification of prodomain regions located N-terminal to the mature inhibin chains that represent coordinately expressed biologically active polypeptides. The prodomain regions or prodomain immunogens are useful in monitoring preproinhibin processing in transformant cell culture or in experiments directed at modulating the clinical condition or reproductive physiology of animals. Thus  $\alpha$  or  $\beta$  chain nucleic acid is used to prepare prodomain sequences from the precursor forms of the inhibin chains, to transform host cells for the recombinant expression of mature inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains, and in diagnostic assays. In particular, regions from inhibins  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains are expressed in recombinant cell culture by a method comprising ligating the nucleic acid encoding the region into a replicable vector under the control of a promoter, transforming a host cell with the vector, culturing the host cell and recovering the prodomain, activin or inhibin from the cultured cell. Inhibin, activin and prodomains produced by the method of this invention are entirely free of homologous source proteins and can be produced in biologically active form.

[0016] The nucleic acids identified herein encode the  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chains of porcine or human inhibin. Recombinant cells are transformed to express  $\alpha\beta_A$  or  $\alpha\beta_B$  inhibins, or to express  $\beta$ -chain heterodimers or homodimers (which are collectively referred to in the literature as activin).  $\beta$ -chain dimers as products of recombinant cells expression are free of homologous proteins with which they ordinarily are associated in nature.

[0017] Inhibin or activin and their nontoxic salts, combined with a pharmaceutically acceptable carrier to form a pharmaceutical composition, are administered to mammals, including humans, for control of fertility. Administration of inhibin decreases fertility in female mammals and decreases spermatogenesis in male mammals, and administration of a sufficient amount induces infertility. Inhibin is also useful in tests to diagnose infertility. Activin has been shown in the literature to be capable of stimulating FSH release from pituitary cells and accordingly is useful as a fertility inducing therapeutic.

[0018] The method of this invention also facilitates the convenient preparation of inhibin, activin and prodomain variants having primary amino acid sequences and/or glycosylation differing from the native analogues, in particular fusions of immunogenic peptides with inhibin, activin or prodomain sequences.

#### Brief Description of the Drawings

#### [0019]

5

10

15

20

25

30

50

55

Fig. 1A is a schematic representation of the porcine α-chain mRNA. Overlapping cDNA clones used in the sequence determination are shown above the diagram of the mRNA structure. Black boxes on the 3' ends of λ clones indicate that these clones were obtained by specific priming. Untranslated sequences are represented by a line, coding sequences are boxed. The unfilled portion represents the coding region for the signal peptide and pro-sequences, and the cross-hatched areas indicates the 134 amino acid α-chain. The scale is in nucleotides from the 5' end of the longest cDNA clone.

Fig. 1B shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of the porcine α-chain precursor. Nucleotides are numbered at the left and amino acids are numbered throughout. The amino acid sequence underlined was used to design a long synthetic DNA probe. The 364 amino acid precursor includes a hydrophobic signal sequence, a pro-region, and the mature α-chain (amino acids 231-364). The proteolytic processing site Arg-Arg (black bar) immediately precedes the NH2-terminus of the mature alpha chain. Several other putative dibasic processing sites present in the pro-region are indicated by open bars. The two potential N-linked glycosylation sites are shown by the cross-hatched bars. The AATAAA box close to the 3' end of the mRNA is underlined.

Fig.2A is a schematic representation of the porcine  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunit mRNAs with coding sequences boxed. The  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunits (dashed) are encoded towards the 3' end of the coding sequences. The 3' and 5' untranslated regions are shown as a line. The length of the 5' and 3' untranslated region of the  $\beta_B$  subunit mRNA is inferred from the size of the mRNA (Fig. 3) and its obvious similarity to the  $\beta_A$  mRNA. Tentative regions of the cDNAs are shown as dashed in the diagram. The relative positions of the overlapping oligo-dT primed cDNA clones and the randomly primed clones ( $\lambda$ PIN $\beta_B$ 1s,  $\lambda$ PIN $\beta_B$ 1s, and  $\lambda$ PIN $\beta_B$ 2s) are indicated. The scale is in nucleotides from the 5' end of the 4.5 kb mRNA.

Fig. 2B is the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the porcine inhibin  $\beta$ -subunit precursors. The  $\beta_B$  sequence is aligned with the  $\beta_A$  sequence for maximum homology. The NH $_2$ -terminal of the  $\beta$ -subunit precursors are indicated by bracket and arrows. Cysteine residues are shaded, possible processing sites are indicated by open bars, and a potential glycosylation site is shown by the cross-hatched box. A very GC-rich region present 3' to the termination codon intron sequences is underlined and overlined in both sequences. Amino acid sequences used to design oligonucleotide probes are underlined, as is the AATAAA polyadenylation signal. There was one nucleotide difference between  $\lambda$ PIN- $\beta_A$ 8 and other clones covering this area. A G-to-A change causes a change of amino acid 278 from a glycine to a serine. The proteolytic processing site Arg Arg Arg Arg Arg (black bar) immediately precedes the NH $_2$  terminus of the mature  $\beta_A$  subunit, with the prosequences located upstream. The amino acids for the  $\beta_A$  subunit only are numbered.

Fig. 3 is a Northern blot analysis of porcine ovarian mRNA with  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunit cDNA hybridization probes. Lanes a, b, c, d, and f are polyA+ mRNA and e and g are total RNA. The position of the 28S and 18S ribosomal RNAs are shown. Lanes a, d, and e were hybridized with an  $\alpha$ -subunit cDNA probe; lanes d, e and g with a  $\beta_A$  subunit specific probe, and lane c with a  $\beta_B$  subunitspecific probe. The  $\alpha$ -subunit mRNA is approximately 1.5 kb, the  $\beta_A$  subunit mRNAs are approximately 4.5 kb. The hybridizations shown in lanes a, b, and c were performed with probes of approximately equal length and specific activity in order to judge relative mRNA levels.

Fig. 4A is a comparison of the human  $\beta$ -TGF amino acid sequence and porcine inhibin  $\beta_A$  and  $\beta_B$  amino acid sequences. The sequences were aligned around the cysteine residues. Identical residues are boxed, while conservative changes are designated by an asterisk.

Fig. 4B compares the  $\alpha$ -subunit sequence with the  $\beta_A$ -inhibin sequence.

Fig. 5 depicts the construction of a representative recombinant expression plasmid for porcine inhibin.

Fig. 6 shows the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the human  $\alpha$ -inhibin cDNA. The 335 amino acid pro-or inhibin sequence is numbered from the hypothesized signal cleavage site. Sixteen amino acids of the signal sequence are numbered -1 through -16. Homology with the porcine sequence predicts a further 12 amino acid residues in the signal sequence. In this and other figures, putative dibasic processing sites are shown by the open bars, glycosylation sites indicated by cross-hatched bars, and amino terminal mature chain processing sites are depicted as black bars. The poly(A) additional signal sequence is underlined. Cysteine residues are shaded.

Fig. 7 is a comparison of the human and porcine  $\alpha$ -inhibin protein sequences. Spaces are introduced to maximize the homology; positions of non-identity are indicated by stars. Numbering is as for the porcine sequence, which is one amino acid shorter than the human.

Fig. 8 shows that the nucleotide and deduced amino acid sequence of the human  $\beta_A$  inhibin signal sequence (residues -28 through -1) is 28 amino acids with the precursor being 378 amino acids in length. The basic processing site is indicated by a black bar, and a potential glycosylation site in the precursor is indicated by a cross-hatched

bar above the sequence. Cysteine residues are shaded.

Fig. 9 illustrates the nucleotide and deduced amino acid sequence of human  $\beta_B$  inhibin cDNA. The sequence commences at a cysteine residue (position 7), which lines up with the cysteine present at residue 7 in the  $\beta_A$  sequence (see Fig. 8). The processing site for the mature  $\beta_B$  inhibin is shown as a black bar and a potential glycosylation site as a cross-hatched bar. Cysteine residues are shaded.

#### **DETAILED DESCRIPTION**

5

20

25

30

35

40

45

50

[0020] The polypeptides of this invention are the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin, as well as their multimer forms (activin and inhibin), their prepro forms and their prodomains, together with glycosylation and/or amino acid sequence variants of each chain or form thereof. Inhibin (including alleles) from human or animal sources inhibits the basal release of FSH but not of LH from anterior pituitary cells while activin does the opposite (hereinafter referred to as "hormonally active" activin or inhibin).

[0021] Generally, amino acid sequence variants will be substantially homologous with the relevant portion of the porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain sequences set forth in Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9. Substantially homologous means that greater than about 70% of the primary amino acid sequence of the candidate polypeptide corresponds to the sequence of the porcine or human chain when aligned in order to maximize the number of amino acid residue matches between the two proteins. Alignment to maximize matches of residue includes shifting the amino and/or carboxyl terminus, introducing gaps as required and/or deleting residues present as inserts in the candidate. For example, see Figs. 2B and 7 where the  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunits or human and porcine  $\alpha$ -inhibin sequences are aligned for maximum homology. Typically, amino acid sequences variants will be greater than about 90% homologous with the corresponding native sequences shown in Figs. 1 B, 2B, 6, 8 and 9.

[0022] Variants that are not hormonally-active fall within the scope of this invention, and include polypeptides that may or may not be substantially homologous with either a mature inhibin chain or prodomain sequence, but which are immunologically cross-reactive with antibodies raised against the native counterpart.

[0023] Hormonally inactive variants are produced by the recombinant or organic synthetic preparation of fragments, in particular the isolated  $\beta$  chains of inhibin, or by introducing amino acid sequence variations so that the molecules no longer demonstrate hormonal activity as defined above.

[0024] Immunological cross-reactivity means that the candidate polypeptide is capable of competitively inhibiting the binding of the hormonally-active analogue to polyclonal antisera raised against the hormonally-active analogue. Such antisera are prepared in conventional fashion by injecting goats or rabbits S.C. with the hormonally-active analogue or derivative in complete Freunds adjuvant, followed by booster intraperitoneal or S.C. injections in incomplete Freunds.

[0025] Variants that are not hormonally active but which are capable of cross-reacting with antisera to hormonally-active inhibin, activin, or prodomains are useful (a) as reagents in diagnostic assays for the native analogues or their antibodies, (b) when insolubilized in accord with known methods, as an agent for purifying anti-native analogue antibodies from antisera, and (c) as an immunogen for raising antibodies to hormonally-active analogues.

[0026] This invention includes the pro and/or prepro sequences of the inhibin  $\alpha$  or  $\beta$  chain precursors, or their immunologically or biologically active fragments, substantially free of the corresponding mature inhibin chains. These sequences for porcine and human inhibin are shown in Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9. The prepro sequence for the porcine  $\alpha$  subunit precursor is the polypeptide comprised by residues 1 to about 230, while the  $\beta_A$  subunit pro sequence is comprised by residues 1 to about 308. These sequences shall be referred to herein as encompassing prodomain sequences.

[0027] The  $\alpha$  and  $\beta$  subunit prodomain sequences are comprised of several domains bounded by proteolysis sites, any one of which is synthesized herein separately or in combination with other domains. The principal porcine  $\beta_A$  domains fall within residues 1 to about 70 (domain I), about 70 to about 110 (domain II), about 110 to about 180 (domain III), about 180 to about 260 (domain IV), and about 270 to about 309 (domain V). In particular, the porcine  $\beta_A$  domains are

CHSAAPDCPSCALATLPKDVPNSOPEMVEAV.

HILNMLHLKKRPDVTQPVPKAALLNAI, LHVGKVGENGYVELEDDIG,
AEMNELMEQTSEIITFAEAGRARKTLRFEISKEGSDLSVVERAEIWLFKVPKANRTRTKV
SIRLFQQQ, PQGSADAGEEAEDVGFPEEKSEVLISEKVVDA,
STWHIFPVSSSIQRLLDQGKSALDIRTACEQCHETGASLVLLG, and

GHSAAPDCPSCALATLPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQPVPKAALLNAI.

[0028] The porcine  $\beta_B$  domains comprise RAAHILLHAVRVSGWLNL as well as homologous  $\beta$  domains having the same sequences. The porcine  $\alpha$  domains comprise

#### GPELDRELVLAKVRALFLDALGPPAVIGEGGDPGV and

GSEPEEDVSQAILFPATGARCGAEPAAGELAREAEEGLFTYVGRPSQHTHSRQVTSAQLWFHTGL DRQGMAAANSSGPLLDLLALSSRGPVAVPMSLGQAPPRWAVLHLAASALPLLTHPVLVLLLRCPLC SCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERA.

5

10

**[0029]** A typical combination domain polypeptide would be  $\beta_A$  domain II linked at its C-terminus to the NH<sub>2</sub>-terminus of  $\beta_A$  domain III. In addition, these domains are fused together by the proteolysis sites found in the sequences shown in Figs. 1B or 2B, by 1 to 4 residue polypeptides that are resistant to hydrolysis (for example, glutaminyl or histidyl residues), or are directly fused, whereby, in all three instances, combination domain polypeptides are produced.

[0030] Principal human  $\alpha$  chain prodomains are approximately residues 30-199 and 1 to 29, human  $\beta A$  prodomains are approximately residues 1-30, 32-40, 43-59, 62-80, 83-185 and 186-230 while human  $\beta_B$  prodomains are approximately residues 1-13, 15-30, 32-59, 62-145, 148-195 and 198-241 (referring to the numbering system adopted in Figs. 6, 8 and 9, respectively). Combination prodomain polypeptides are within the scope hereof, for example, the  $\beta_A$  prodomain at about 43-80, and  $\beta_B$  prodomains at about 1-30 and about 32-145. The preferred human  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chain prodomains are about residues 1-29, about 43-80 and about 1-30, respectively.

[0031] The intact isolated prepro or prodomain  $\beta_A$ ,  $\beta_B$  or  $\alpha$  sequences are best synthesized in recombinant-cell culture. The individual subcomponent domains are synthesized by routine methods of organic chemistry or by recombinant cell culture. They then are labelled with a radioisotope or other detectable group such as an enzyme or fluorophore in accord with known methods and used in standard competitive immunoassays to detect the levels of prepro or proforms of inhibin, including individual domains, in transformants with DNA encoding such forms or their precursors. This assay is useful in determining whether proteolytic hydrolysis of proinhibin is occurring in the host transformants or their culture media. The assay also is useful in determining whether a rate limiting step in recombinant synthesis is translation of mRNA into the prepro forms or processing of the prepro forms into mature inhibin. For example, high levels of prepro or pro inhibin in cell lysates, but relatively low levels of secreted mature inhibin, would suggest that the host cell is adequately transcribing and translating the inhibin DNA, but is not processing the precursors at an adequate rate. Thus, in this case one would select an alternate host cell rather than concentrating on improving the transcription or translation efficiency of the transforming plasmid, e.g., by selecting an alternate promoter. The prodomain sequences also are believed to be involved in coordinate modulation of animal physiology in reproductive cycles and fertility.

[0032] Amino acid sequence variants are any one of 1) hormonally-active, or 2) cross reactive with antibodies raised against mature inhibin or prodomain  $\alpha$  or  $\beta$  chain sequences, but are characterized by a primary amino acid sequence that departs from the sequence of natural inhibins or prodomain sequences. These derivatives ordinarily are prepared by introducing insertions, deletions or substitutions of nucleotides into the DNA encoding the target DNA to be modified in order to encode the variant, and thereafter expressing the DNA in recombinant cell culture. Polypeptides having up to about 100-150 residues also are conveniently prepared by in vitro synthesis. Such variants are characterized by the predetermined nature of the variation, a feature that sets them apart from naturally occurring allelic or interspecies variation. The variants may exhibit the same qualitative biological activity as the naturally-occurring analogue or may act antagonistically towards such analogues.

[0033] While the site for introducing a sequence variation is predetermined, it is unnecessary that the mutation <u>per se</u> be predetermined. For example, in order to optimize the performance of mutation at a given site, random mutagenesis may be conducted at the target codon or region and the expressed inhibin mutants screened for the optimal combination of desired activity. Techniques for making substitution mutations at predetermined sites in DNA having a known sequence is well known, for example M13 primer mutagenesis.

[0034] Mutagenesis is conducted by making amino acid insertions, usually on the order of about from 1 to 10 amino acid residues, or deletions of about from 1 to 30 residues. Deletions or insertions preferably are made in adjacent pairs, i.e. a deletion of 2 residues or insertion of 2 residues. Substitutions, deletions, insertions or any subcombination may be combined to arrive at a final construct. Insertions include amino or carboxyl-terminal fusions, e.g. a hydrophobic extension added to the carboxyl terminus. Preferably, however, only substitution mutagenesis is conducted. Obviously, the mutations in the encoding DNA must not place the sequence out of reading frame and preferably will not create complementary regions that could produce secondary mRNA structure.

[0035] Not all mutations in the DNA which encode the polypeptides herein will be expressed in the final secreted product. For example, a major class of DNA substitution mutations are those in which a different secretory leader or

signal has been substituted for the native porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain secretory leader, either by deletions within the leader sequence or by substitutions, wherein most or all of the native leader is exchanged for a leader more likely to be recognized by the intended host. For example, in constructing a procaryotic expression vector the porcine or human  $\alpha$  or  $\beta$  chain secretory leader is deleted in favor of the bacterial alkaline phosphatase or heat stable enterotoxin II leaders, and for yeast the leader is substituted in favor of the yeast invertase, alpha factor or acid phosphatase leaders. However, the porcine and human secretory leaders are recognized by many heterologous higher eukaryotic cells. When the secretory leader is "recognized" by the host, the host signal peptidase is capable of cleaving a fusion of the leader polypeptide fused at its C-terminus to the mature inhibin or prodomain such that mature inhibin or prodomain polypeptide is secreted.

[0036] Another major class of DNA mutants that are not expressed in final form as amino acid sequence variations are nucleotide substitutions made in the DNA to enhance expression, primarily to avoid 5' stem and loop structures in the transcribed mRNA (see de Boer et al., EP 75,444A) or to provide codons that are more readily transcribed by the selected host, e.g. the well-known preference codons for <u>E. coli</u> or yeast expression. These substitutions may or may not encode substituted amino acid residues, but preferably do not.

10

30

35

45

[0037] Insertional and deletional amino acid sequence variants are proteins in which one or more amino acid residues are introduced into or removed from a predetermined site in the target inhibin, activin, prodomain or proform of inhibin or activin. Most commonly, insertional variants are fusions of heterologous proteins or polypeptides to the amino or carboxyl terminus of the  $\alpha$  or  $\beta$  chains, the prodomains or other inhibin derivatives. Immunogenic derivatives are made by fusing an immunogenic polypeptide to the target sequence, e.g. a prodomain polypeptide, by synthesis in vitro or by recombinant cell culture transformed with DNA encoding the fusion. Such immunogenic polypeptides preferably are bacterial polypeptides such as trpLE, beta-galactosidase and-the like, together with their immunogenic fragments. Other insertions entail inserting heterologous eukaryotic (e.g. the herpes virus gD signal) or microbial secretion signal or protease processing sequences upstream from the NH2-terminus of the protein to be secreted. Deletions of cysteine or other labile residues also may be desirable, for example in increasing the oxidative stability of the  $\alpha$  or  $\beta$  chain. Deletion derivatives will produce  $\alpha$  or  $\beta$  chain fragments. Such fragments, when biologically or immunologically active, are within the scope herein. For instance, a fragment comprising  $\beta_B$  or  $\beta_A$  residues about from 11 to 45 (numbered from mature Gly<sub>1</sub>) is to be included within the scope

[0038] Immunogenic conjugates of prodomain polypeptides, inhibin and activin are readily synthesized in recombinant cell culture as fusions with immunogenic polypeptides, e.g. beta-lactamase or viral antigens such as herpes gD protein, or by preparation of the polypeptides in unfused form (by recombinant or in vitro synthetic methods) followed by covalent cross-linking to an immunogenic polypeptide such as keyhole limpet hemocyanin or STI using a divalent cross-linking agent. The immunogenic polypeptides are formulated with a vaccine adjuvant, e.g. alum or Freunds. Methods for preparing proteins in adjuvants and for cross-linking are well-known per se and would be employed by one skilled in the art, as are methods for vaccinating animals. The immunogenic conjugates are useful in preparing antibodies to the prodomain region for use in monitoring inhibin manufacture or for in vivo vaccination with the objective of raising antibodies capable of modulating animal physiology in reproductive cycles and fertility. Typically, the prodomain or its immunogen is administered in varied doses to fertile laboratory animals or swine and the reproductive cycles and fertility of the animals monitored, together with assays of serum levels of anti-immunogen or prodomain by routine competitive or sandwich immunoassay.

[0039] Substitution derivatives are produced by mutating the DNA in a target codon, so that thereafter a different amino acid is encoded by the codon, with no concomitant change in the number of residues present in the molecule expressed from the mutated DNA. Substitutions or deletions are useful for example in increasing the stability of the proteins herein by eliminating proteolysis sites, wherein residues are substituted within or adjacent to the sites or are deleted from the sites, or by introducing additional disulfide bonds through the substitution of cysteine for other residues. Substitutions are useful for facilitating the synthesis or recovery of mature or prodomain  $\alpha$  or  $\beta$  chains. For example, methionine residues within the mature inhibin sequences are substituted or deleted, prepro sequences deleted, methionine inserted at the -1 site immediately NH<sub>2</sub> terminal to the mature NH<sub>2</sub> terminal residue and another sequence inserted N-terminal to the exogenous methionine. The inhibin derivative in this case is expressed as a fusion having an intermediate methionyl residue, which in turn is cleaved at this residue by cyanogen bromide in accordance with known practice. The mature inhibin derivative released from the fusion is recovered.

[0040] Exemplary porcine inhibin derivatives are  $[Asn_{266}-SGln]lnh\alpha$  (to remove the putative glycosylation site),  $[Cys_{325}$  or  $Cys_{324}-\Delta]lnh\alpha$ ,  $[Cys_{361}$  or  $Cys_{363}-\Delta]lnh\alpha$ ,  $[Lys_{321}$  or  $Lys_{322}-\Delta]lnh\beta_A$  or  $[Lys_{322}-\Delta]lnh\beta_A$  (to inactivate a potential proteolysis site),  $[Lys_{315}-\Delta rg; Val_{316}-\Delta rr] lnh\beta_A$  (to create a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid),  $[Cys_{388}$  or  $Cys_{390}-\Delta]lnh\beta_A$ ,  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_A$ ,  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_A$ ,  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , wherein  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , wherein  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$ , wherein  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  and  $[Lys_{411}-\Delta rr] lnh\beta_B$  are those used for the corresponding [Ly

[0041] The  $Inh\beta_A$  amino acid positions which are principal candidates for mutational substitution or deletion (or adjacent to which residues may be inserted) include residues 293-297, 364-376 and 387-398 (Fig. 8), Preferably, the

proline, cysteine and glycine residues within these sequences are not modified. Candidates having greater potency than inhibin or activin, or which serve as inhibin or activin antagonists, are identified by a screening assay wherein the candidate is diluted into solutions containing constant amounts of inhibin or activin and the compositions assayed in the rat pituitary cell assay. Candidates which neither antagonize or agonize inhibin or activin are screened for utility in immunoassays for inhibin or activin by measuring competitive immunodisplacement of labelled inhibin or activin of the native hormones from polyclonal antibody directed against the native hormones. Exemplary contemplated sequence variants of lnh $\beta_A$  include Phe<sub>302</sub>->Ile or Leu; Gln<sub>297</sub>->Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>->Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>->Tyr or Phe; lle<sub>311</sub>->Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>->Trp or Thr; His<sub>318</sub>->Lys; Ala<sub>319</sub>->Ser; Asn<sub>320</sub>->Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>->Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>->Tyr (a TGF- $\beta/\beta_A$  intrachain hybrid); His<sub>353</sub>->Asp; His<sub>353</sub>->Lys (a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid); Phe<sub>356</sub>->Tyr; Val<sub>364</sub>->Phe; Val<sub>364</sub>->Leu; Tyr<sub>375</sub>->Thr; Tyr<sub>376</sub>->Trp; Asn<sub>389</sub>->Gln, His or Lys; lle<sub>391</sub>->Leu or Thr; Met<sub>390</sub>->Leu or Ser; Val<sub>392</sub>->Phe, Glu, Thr or lle. Comparable modifications are made in the human  $\beta_B$  chain. For example, Inh $\beta_A$  contains a phenylalanyl residue at position 302, and Inh $\beta_B$  also contains a phenylalanyl residue at a homologous position (264, Fig. 9) when aligned in the same fashion as is shown for porcine  $\beta_B$  in Fig. 4A. Thus, since the Phe<sub>302</sub>residue of  $\beta_A$  is described above as substituted by isoleucinyl or leucinyl, the Phe<sub>264</sub> of  $\beta_B$  is substituted with the same residues.

[0042] A factor in establishing the identity of a polypeptide as inhibin, activin or an inhibin variant is the ability of antisera which are capable of substantially neutralizing the hormonal activity of mature inhibin or activin to also substantially neutralize the hormonal activity of the polypeptide in question. However it will be recognized that immunological identity and hormonal activity are not necessarily coextensive. For example, a neutralizing antibody for inhibin may not bind a candidate protein because the neutralizing antibody happens to not be directed to specifically bind a site on inhibin that is critical to its activity. Instead, the antibody may bind an innocuous region and exert its neutralizing effect by steric hinderance. Therefore a candidate protein mutated in this innocuous region might no longer bind the neutralizing antibody, but it would nonetheless be inhibin in terms of substantial homology and biological activity.

[0043] It is important to observe that characteristics such as molecular weight, isoelectric point and the like for a native or wild type mature inhibin or activin obtained from follicular fluid or other tissue sources are descriptive only for the native form. Variants contemplated by the foregoing definition will include other polypeptides which will not exhibit all of the characteristics of native analogue. For example, inhibin derivatives like the insertion mutants, deletion mutants, or fusion proteins described above will bring inhibin outside of the molecular weight established for the corresponding native inhibin because fusion proteins with mature inhibin or proinhibin itself as well as insertion mutants will have a greater molecular weight than native, mature inhibin. On the other hand deletion mutants of native, mature inhibin will have a lower molecular weight. Finally, post-translational processing of preproinhibin chains in heterologous cell lines may not be accomplished with the fidelity exercised by the homologous host cell, thereby resulting in some variation in the amino termini of the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. This variation may be encountered as residual prosequence remaining with the mature protein, or the loss of several mature residues that are cleaved off with the prosequence. The same is true with processing of the preprotein in heterologous recombinant cells.

[0044] Covalent modifications of inhibin, activin or prodomains are included within the scope hereof and include covalent or aggregative conjugates with other chemical moieties. Covalent derivatives are prepared by linkage of functionalities to groups which are found in the inhibin amino acid side chains or at the N-or C-termini, by means known in the art. For example, these derivatives will include: aliphatic esters or amides of the carboxyl terminus or residues containing carboxyl side chains, e.g., aspartyl residues; O-acyl derivatives of hydroxyl group-containing residues such as seryl or alanyl; and N-acyl derivatives of the amino terminal amino acid or amino-group containing residues, e.g. lysine or arginine. The acyl group is selected from the group of alkyl-moieties (including C3 to C10 normal alkyl), thereby forming alkanoyl species, and carbocyclic or heterocyclic compounds, thereby forming aroyl species. The reactive groups preferably are difunctional compounds known per se for use in cross-linking proteins to insoluble matrices through reactive side groups, e.g. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester. Preferred derivatization sites are at histidine residues.

35

45

[0045] Covalent or aggregative derivatives of mature inhibin, activin or prodomain sequences are useful as reagents in immunoassay or for affinity purification procedures. For example, inhibin or prodomain is insolubilized by covalent bonding to cyanogen bromide-activated Sepharose® by methods known per se or adsorbed to polyolefin surfaces (with or without glutaraldehyde cross-linking) for use in the assay or purification of anti-inhibin or anti-prodomain anti-bodies or cell surface receptors. Inhibin or a prodomain sequence also is labelled with a detectable group, e.g., radioiodinated by the chloramine T procedure, covalently bound to rare earth chelates or conjugated to another fluorescent moiety for use in diagnostic assays, especially for diagnosis of inhibin or prodomain levels in biological samples by competitive-type immunoassays.

[0046] DNA which encodes the complete  $\alpha$  and  $\beta$  chains of inhibin/activin is obtained by chemical synthesis, by screening reverse transcripts of mRNA from ovary, or by screening genomic libraries from any cell. It may be more efficient to simply synthesize portions of the DNA desired since screening is required to identify DNA to cDNA or genomic libraries that encode the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Synthesis also is advantageous because unique restriction sites can be introduced at the time of preparing the DNA, thereby facilitating the use of the gene in vectors containing restriction

sites otherwise not present in the native sequence, and steps can be taken to enhance translational efficiency as discussed above, without the need to further modify the DNA as by mutagenesis or the like. cDNA encoding the  $\alpha$  or  $\beta$  chains is free of untranslated intervening sequences (introns) as well as free of flanking DNA encoding other proteins homologous to their source.

[0047] DNA encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  chains is obtained from other sources than porcine and human by (a) obtaining a cDNA library from the ovary of the target animal, (b) conducting Southern analysis with labelled DNA encoding porcine or human  $\alpha$  and  $\beta$  chains or fragments thereof (generally, greater than 100 bp) in order to detect clones in the cDNA library that contain homologous sequences, (c) analyzing the clones by restricting enzyme analysis and nucleic acid sequencing so as to identify full-length clones and, if full length clones are not present in the library, recovering appropriate fragments from the various clones and ligating them at restriction sites common to the clones to assemble a clone encoding-the full-length molecule. As shown infra, any sequences missing from the library can be obtained by the 3' extension on ovarian mRNA of synthetic oligodeoxynucleotides complementary to cDNA identified by screening the library, or homologous sequences are supplied from known animal cDNAs. This is particularly useful in constructing pre or prepro inhibin sequences to facilitate processing of preproinhibin to mature inhibin from the desired species.

[0048] Porcine and human ovarian cDNA libraries initially were probed for DNA encoding inhibin sequences using labelled oligonucleotides whose sequence was based on the partial amino acid sequence determined from analysis of purified porcine inhibin or, in the case of human cDNA, porcine cDNA probes. However, once having described cDNA encoding human and porcine inhibin and prodomains, one skilled in the art would realize that precisely hybridizing probes can be prepared from the described sequences in order to readily obtain the remainder of the desired human or porcine gene.

[0049] Nucleotide sequence analyses of identified porcine and human cDNA clones revealed the structures of the biosynthetic precursors of both forms of inhibin. Interestingly, the two inhibin chains are not derived from a single processed precursor. Instead, the two chains are translated from separate mRNAs and then assembled into the disulfide crosslinked two-chain molecule.

[0050] Figs. 1B and 2B and 6, 8 and 9 depict the DNA encoding the polypeptide chains constituting porcine and human preproinhibin and preproactivin. Obviously, degenerate codons may be substituted for those disclosed in these figures where the same amino acid is encoded. The DNA of Figs. 1B, 2B, 6, 8 and 9 is mutated in order to encode the amino acid variants of the  $\alpha$  and  $\beta$ chains described above. In particular, the prepro sequences are deleted and a start codon inserted immediately 5' to the mature chain in question so that the chain is expressed directly in recombinant culture. The DNA also is labelled, e.g. with radioactive phosphorous, and used to screen ovarian cDNA libraries from other species to identify  $\alpha$  or  $\beta$  chain encoding DNA from such other species as is generally described above.

[0051] Covalent labelling of this DNA is accomplished with a detectable substance such as fluorescent group, a radioactive atom or a chemiluminescent group by methods known per se. The labelled DNA is then used in conventional hybridization assays. Such assays are employed in identifying vectors and transformants as described in examples infra, or for in vitro diagnosis such as detection of mRNA in tissues.

35

[0052] Lengthy sequences desirably are synthesized in host cells transformed with vectors containing DNA encoding them, e.g. inhibin or prodomain sequence. Vectors are used to amplify the DNA which encodes the chains, either in order to prepare quantities of DNA for further processing (cloning vectors) or for expression of the chains (expression vectors). An expression vector is a replicable DNA construct in which a DNA sequence encoding an  $\alpha$  or  $\beta$  chain is operably linked to suitable control sequences capable of effecting their expression in a suitable host. Cloning vectors need not contain expression control sequences. Such control sequences include a transcriptional promoter, an optional operator sequence to control transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosomal binding sites (for prokaryotic expression), and sequences which control termination of transcription and translation. The vector should include a selection gene to facilitate the stable expression of the desired polypeptide and/or to identify transformants. However, the selection gene for maintaining  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain expression can be supplied by a separate vector in cotransformation systems using eukaryotic host cells.

[0053] Vectors comprise plasmids, viruses (including phage), and integratable DNA fragments i.e., fragments that are integratable into the host genome by recombination. The vectors described herein for use in eukaryotic cell expression of inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains contain plasmid sequences for cloning in microbes, where the plasmid replicates autonomously from the host genome, but the DNA is believed to integrate into the eukaryotic host cell genome upon transformation. Similarly, bacillus vectors that genomically integrate by homologous recombination in bacillus also are useful. However, all other forms of vectors which serve an equivalent function and which are, or become, known in the art are suitable for use herein.

[0054] Suitable vectors generally will contain replicon (origins of replication, for use in non-integrative vectors) and control sequences which are derived from species compatible with the intended expression host. Transformed host cells are cells which have been transformed or transfected with vectors containing inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chain encoding DNA. Transformed host cells contain cloned DNA and, when transformed with an expression vector, also express the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. The expressed polypeptides will be deposited intracellularly or secreted into either the periplasmic

space or the culture supernatant, depending upon the host cell selected and the presence of suitable processing signals in the expressed protein, e.g. homologous or heterologous signal sequences.

[0055] DNA regions are operably linked when they are functionally related to each other. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operably linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. Generally, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous and, in the case of secretory leaders, contiguous and in reading phase.

[0056] Suitable host cells are prokaryotes, yeast or higher eukaryotic cells. Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example <u>E. coli</u> or Bacilli. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. A preferred host cell is <u>E. coli</u> 294 (ATCC 31,446) although other prokaryotes such as <u>E. coli</u> 8, <u>E. coli</u> X1776 (ATCC 31 537), <u>E. coli</u> W3110 (ATCC 27 325), pseudomonas species, or <u>Serratia Marcesans</u> are suitable.

[0057] Expression vectors for host cells ordinarily include an origin of replication (where extrachromosomal amplification is desired, as in cloning, the origin will be a bacterial origin), a promoter located upstream from the inhibin coding sequences, together with a ribosome binding side (the ribosome binding or Shine-Dalgamo sequence is only needed for prokaryotic expression), RNA splice site (if the inhibin DNA contains genomic DNA containing one or more introns), a polyadenylation site, and a transcriptional termination sequence. As noted, the skilled artisan will appreciate that certain of these sequences are not required for expression in certain hosts. An expression vector for use with microbes need only contain an origin of replication recognized by the intended host, a promoter which will function in the host and a phenotypic selection gene, for example, a gene encoding proteins conferring antibiotic resistance or supplying an auxotrophic requirement. Inhibin DNA is typically cloned in E. coli using pBR322, a plasmid derived from an E. coli species (Bolivar, et al., 1977 "Gene" 2: 95). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells.

[0058] Expression vectors, unlike cloning vectors, must contain a promoter which is recognized by the host organism. This is generally a promotor homologous to the intended host. Promoters most commonly used in recombinant DNA construction include the  $\beta$ -lactamase (penicillinase) and lactose promoter systems (Chang et al., 1978, "Nature", 275: 615; and Goeddel et al., 1979, "Nature" 281: 544), a tryptophan (trp) promoter system (Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057 and EPO Appl. Publ. No. 36,776) and the tac promoter [H. De Boer et al., 1983, "Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A." 80: 21-25]. While these are the most commonly used, other known microbial promoters are suitable. Details concerning their nucleotide sequences have been published, enabling a skilled worker operably to ligate them to DNA encoding inhibin in plasmid vectors (Siebenlist et al., 1980, "Cell" 20: 269) and the DNA encoding inhibin or its derivative. Promoters for use in prokaryotic expression systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the inhibin, i.e., the S.D. sequence is positioned so as to facilitate translation. Generally, this means that the promoter and S.D. sequences located upstream from the second codon of a bacterial structural gene are substituted for the sequences of prepro inhibin located 5' to the mature  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.

[0059] In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as yeast cultures are transformed with inhibin-encoding vectors. Saccharomyces cerevisiae, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other strains are commonly available and useful herein. Yeast vectors generally will contain an origin of replication from the 2 micron yeast plasmid or an autonomously replicating sequence (ARS), a promoter, DNA encoding the α and/or β chain sequences for polyadenylation and transcription termination, and a selection gene. A suitable plasmid for expression in yeast is YRp7, (Stinchcomb et al., 1979, "Nature", 282: 39; Kingsman et al., 1979, "Gene", 7: 141; Tschemper et al., 1980, "Gene", 10:157). This plasmid already contains the trp1 gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, 1977, "Genetics", 85: 12). The presence of the trpl lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

[0060] Suitable promoting sequences in yeast vectors include the promoters for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., 1980, "J. Biol. Chem.", 255: 2073) or other glycolytic enzymes (Hess et al., 1968, "J. Adv. Enzyme Reg.", 7: 149; and Holland et al., 1978, "Biochemistry", 17, 4900), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylate, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression ar further described in R. Hitzeman et al., EP 73,657A. [0061] Other yeast promoters, which have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the aforementioned metallothionein and glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, as well as enzymes responsible for maltose and galactose utilization. In constructing suitable expression plasmids, the termination sequences associated with these genes are also ligated into the expression vector 3' of the

inhibin or derivative coding sequences to provide termination and polyadenylation of the mRNA.

[0062] Cultures of cells derived from multicellular organisms are the preferred host cells herein because it is believed that expression of hormonally active inhibin or activin will only occur in such cells, with microbial expression resulting at most only in immunological cross-reactivity. In principle, any higher eukaryotic cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. Propagation of vertebrate cells in culture per se has become a routine procedure in recent years [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)].

[0063] Suitable host cells for expressing α or β chains in higher eukaryotes include: monkey kidney CVI line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CRL 10); chinese hamster ovarycells-DHFR (described by Urlaub and Chasin, PNAS (USA) 77: 4216, [1980]); mouse sertoli cells (TM4, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23: 243-251 [1980]); monkey kidney cells (CVI ATCC CCL 70); african green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060652, ATCC CCL 51); rat hepatoma cells (HTC, M1, 54, Baumann, M., et al., J. Cell Biol. 85: 1-8 [1980]) and TRI cells (Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 [1982]).

[0064] The transcriptional and translation control sequences in vertebrate cell expression vectors preferably are provided from viral sources. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, and most preferably Simian Virus 40 (SV40). The early and late promoters of SV40 are particularly useful because both are obtained easily from the virus as a fragment which also contains the SV40 viral origin of replication (Fiers et al., 1978, "Nature", 273: 113). Smaller or larger SV40 fragments may also be used, provided the approximately 250 bp sequence extending from the Hind III site toward the Bgl I site located in the viral origin of the replication is included. Further, it is also possible to utilize the genomic promoters, control and/or signal sequences normally associated with the α or β-chains, provided each control sequences are compatible with and recognized by the host cell.

[0065] An origin of replication may be provided either by construction of the vector to include an exogenous origin, such as may be obtained from SV40 or other viral (e.g. Polyoma, Adenovirus, VSV, or BFV) source, or may be provided by the host cell chromosomal replication mechanism. If the vector is integrated into the host cell chromosome, the latter is often sufficient.

[0066] Rather than using vectors which contain viral origins of replication, mammalian cells are cotransformed with DNA encoding a selectable marker and DNA encoding the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains. An example of a suitable selectable marker is dihydrofolate reductase (DHFR) or thymidine kinase. Such markers are proteins, generally enzymes that enable the identification of transformant cells, i.e., cells which had been competent to take up exogenous DNA. Generally, identification is by survival of transformants in culture medium that is toxic to untransformed cells or from which the cells cannot obtain a critical nutrient without having taken up the marker protein.

[0067] In selecting a preferred host mammalian cell for transfection by vectors which comprise DNA sequences encoding both inhibin and DHFR, it is appropriate to select the host according to the type of DHFR protein employed. If wild type DHFR protein is employed, it is preferable to select a host cell which is deficient in DHFR thus permitting the use of the DHFR coding sequence as marker for successful transfection in selective medium which lacks hypoxanthine, glycine, and thymidine (hgt). An appropriate host cell in this case is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub and Chasin, 1980, "Proc., Nat'l. Acad. Sci." (USA) 77: 4216.

40 [0068] On the other hand, if DNA encoding DHFR protein with low binding affinity for methotrexate (MTX) is used as the controlling sequence, it is not necessary to use DHFR resistant cells. Because the mutant DHFR is resistant to MTX, MTX containing media can be used as a means of selection provided that the host cells are themselves MTX sensitive. Most eukaryotic cells which are capable of absorbing MTX appear to be methotrexate sensitive. One such useful cell line is a CHO line, CHO-KI (ATCC No. CCL 61). Preferably, transformants are first selected for neomycin resistance (the transfection is conducted together with DNA encoding the neomycin resistance gene), followed by MTX amplification of the α and/or β chain expression as the case may be. See Kim et al., "Cell" 42: 129-138 (1985) and EP 160,457A.

[0069] Other methods suitable for adaptation to the synthesis of  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains in recombinant vertebrate cell culture are described in M-J. Gething <u>et al.</u>, "Nature" <u>293</u>: 620-625 (1981); N. Mantei <u>et al.</u>, "Nature" <u>281</u>: 40-46; and A. Levinson <u>et al.</u>, EP 117,060A and 117,058A.

[0070] The inhibin  $\alpha$  chain is expressed in recombinant cell culture with or without either of the  $\beta$ -chain molecules. Similarly, host cells are transformed with DNA encoding either or both of the mature  $\beta$ -chains. Based on analogy to TGF- $\beta$ , the mature  $\beta$ -chains are capable of forming homodimers or  $\beta_A/\beta_B$  heterodimers upon expression in recombinant culture. These structures are not inhibin and will be referred to herein as  $\beta$ -chain dimers or activin. These are useful in the preparation of active inhibin, serving as sources of the  $\beta$ -chain, or are used as gel electrophoresis standards to detect the diversion into  $\beta$ -chain dimers of  $\beta$ -chains synthesized in  $\alpha$  and  $\beta$  chain cotransformants. As will be seen in Example 4, this is not a hypothetical problem. Of course, the dimers are also useful in modulating reproduction as noted above.

[0071]  $\beta$ -chain hetero or homodimers are separated by <u>in vitro</u> unfolding of the individual chains followed by oxidative disulfide bond formation with the  $\alpha$ -chain in accord with processes generally known <u>per se.</u> Preferably, however, in preparing mature inhibin the recombinant host is transformed with DNA encoding both the  $\alpha$  and either of the  $\beta$ -chains. The intact hormonally active molecule is then assembled by the host cell <u>in vivo</u>, and it is thus unnecessary to combing the two chains by <u>in vitro</u> processing. The DNA encoding the  $\alpha$  and  $\beta$ -chains is preferably located on the same vector, and under the control of the same promoter, but this is not essential.

[0072] Certain  $\beta$ -chain amino acid sequence variants identified in the screening procedure will not bind to pituitary cell surface receptors nor as a consequence will they exhibit hormonal activity. Such variants, when expressed as homodimers in recombinant cell culture, are useful in immunoassays for activin when they bear immunological epitopes cross-reactive with the native  $\beta$ -chain. In addition, such variants are coexpressed with DNA encoding hormonally active  $\beta$ -chain to yield a hybrid bearing native and variant  $\beta$ -chain. In this case the variant serves to stabilize the structure of the native  $\beta$ -chain. This form of  $\beta$ -chain heterodimer is useful, like the homodimer, in immunoassays for activin. It may also function as an activin antagonist.

[0073] The activin/inhibin  $\beta$ -chains also are coexpressed with TGF- $\beta$  in order to produce  $\beta$ -chain/TGF- $\beta$  hybrids. Vectors and methods for the expression of TGF- $\beta$  are known. For example, see Derynck et al., Human Transforming Growth Factor- $\beta$  Complementary DNA Sequence and Expression in Normal and Transformed Cells "Nature" 316: 701-705 (1985). Contransformation of mammalian host cells by vectors bearing the TGF- $\beta$  gene as described by Derynck et al. together with the  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains of activin/inhibin will result in secretion of a proportion of a  $\beta$ -chain/TGF- $\beta$  hybrid dimers. This hybrid is useful in preparing TGF- $\beta$ / $\beta$ -chain immunogens or in immunoassays.

[0074] Inhibin, activin or prodomain sequences are recovered from transformed cells in accord with per se known procedures. When a polypeptide is expressed in recombinant bacteria as a refractile body, the desired polypeptide is recovered and refolded by conventional methods. Alternatively, the culture supernatants from transformed cells that secrete activin or inhibin, preferably mammalian cells, are simply separated from the cells by centrifugation. Then the inhibin generally is purified by successive purification procedures that include heparin-Sepharose affinity chromatography, gel filtration and at least one and preferably several RP-HPLC (reverse phase high pressure liquid chromatography) steps using different conditions in the stationary phase and/or mobile phase. Prodomain sequences produced by in vitro synthesis will be purified by conventional methods.

[0075] The prodomain polypeptides that are preferred for use herein are recovered from the culture media of recombinant cells transformed to synthesize the  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains as appropriate for the desired prodomain. Specifically, they are recovered by separating the culture medium polypeptides on native electrophoresis gel, excising bands having the predicted molecular weight and thereafter purifying the eluted polypeptides further, for example by FPLC or HPLC, followed by amino acid sequence determination for the substantially homogeneous separated polypeptides. Purified prodomain polypeptides then are used to raise antibodies, e.g., in rabbits, which when used in immunoaffinity purification will simplify the recovery of the prodomains.

[0076] In the preferred procedure for isolating porcine hormonally active inhibin, clarified transformant culture supernatant or cell lysate is first purified by heparin-Sepharose® affinity chromatography, next by gel filtration on Sephacryl® S-200 gel and then with four successive RP-HPLCs using different mobile phase gradients and/or derivatized silica supports. Preferably, stationary phases having relatively low hydrophobicity are used, with C3-C8 columns being preferred and C3-C5 and phenyl columns being particularly preferred. Solute specificity of the mobile phase is preferably adjusted by varying the concentration of an organic component, particularly acetonitrile. Although a single RP-HPLC fractionation significantly increases the purity relative to the gel-filtrated material, two or more, and preferably four, RP-HPLC purifications are generally performed subsequent to successive treatment by heparin-Sepharose chromatography and gel filtration. This method has been found to be adaptable to the purification of human inhibin from recombinant cell culture as well.

[0077] The first step of the purification is heparin-Sepharose affinity chromatography, in which the protein is adsorbed to the Sepharose-bound heparin moieties under application conditions, and the adsorbed inhibin material is recovered by 1M NaCl elution. This step greatly expedites the purification procedure for crude extracts because it allows a relatively large volume of a crude extract to be processed fairly rapidly while recovering an amount of protein exhibiting total inhibin activity equal to at least 90% of that of the crude extract.

[0078] For the detection of inhibin activity in the various column fractions, aliquots ranging from 0.01% to 0.1% by volume are removed, and after added 100 µg human serum albumin in 100 µl water, the solvents were evaporated in a Speed-Vac concentrator (Savant, Hicksville, N.Y.). The residue as redissolved in 3 ml 1% fetal bovine serum in HDMEM, filtered through a Millex-GS 0.22 µm filter (Millipore Corp., Bedford, MA) and assayed in duplicate. To speed up the bioassays during the purification process, only basal inhibition of FSH secretion exerted by the inhibin activity is determined and plotted in the region where the inhibin proteins were expected to migrate in the chromatograms.

[0079] To perform the heparin-Sepharose affinity chromatography, cell debris is spun down in a Beckman J2-21 centrifuge (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA.) using a JA-20 rotor at 10,000 rpm for 30 minutes. One half of the supernatant is diluted in 10 times its volume by the addition of 0.01 M Tris-HCI containing 0.1 M NaCl, pH 7, in an

Erlenmeyer flask and pumped simultaneously via silastic tubes (0.76 mm ID) into heparin-Sepharose® (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.) columns (3.5 x 9 cm) by two Rabbit 4-channel peristaltic pumps (Rainin Instrument Co., Inc., Emeryville, CA) at 40 ml/hr per column. After all the fluid has been pumped through the heparin-Sepharose, the eight columns are washed simultaneously with 0.01 M Tris-HCl, pH 7, containing 0.1 M NaCl in the same manner. The adsorbed proteins with inhibin activity are removed by washing the eight columns simultaneously with 0.01 M Tris-HCl containing 1 M NaCl, pH 7, as above, and the wash is collected into fractions. The inhibin activity is monitored by the in vitro bioassay described above. The columns are regenerated by further washing with 2M NaCl in 0.01 M Tris-HCl, pH 7, and re-equilibrated with 0.01 M Tris-HCl containing 0.1 M NaCl for purification of remaining extract. [0080] Next, the material is fractionated by gel filtration to separate proteins generally according to their molecular weights. The fractions having inhibin activity extracted by the heparin-Sepharose columns were pooled and dialyzed overnight to remove NaCl in a 28.6 mm cylinder diameter Spectrapor No. 3 membrane tubing with M<sub>r</sub> cutoff at 3,500 (Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, CA.) against 30% acetic acid. The retained fluid is centrifuged, as above, to remove a white precipitate, and the supernatant is divided into equal portions for applying to 5 x 100 cm Sephacryl S-200 superfine columns (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.). Each column is eluted with 30% acetic acid at 20 ml for 22 min., and the column fractions are monitored by UV absorption at 280 nm and by bioassay. [0081] The bioassay-positive protein from the S-200 columns is pooled and lyophilized. The lyophilized material is dissolved in 0.2N acetic acid (1 ml/ml) and filtered through a Millex-HA 0.45 µm filter (Millipore Corp., Bedford, MA.). The filtrate is applied directly onto a 1 x 25 cm Vydac 5-µm particle-size C4 column (The Separations Group Hesperia, CA.) and developed with a gradient of TEAP buffer. In the TEAP system, buffer A consists of 0.25 N triethylammonium phosphate pH 3, and buffer B is 80% acetonitrile in buffer A. After all the filtrate had been loaded, the column is washed with the aqueous buffer A until the UV absorption reached baseline. The fractions exhibiting inhibin activity are separated in a Beckman 332 gradient liquid chromatography system (Beckman Instruments, Inc., Berkeley, CA.) equipped with a Spectroflow 757 UV detector (Kratos Analytical Instruments, Ramsey, N.J.), a Soltec 220 recorder (Soltec Corp., Sun Valley, CA.) and a Redirac 2112 fraction collector (LKB Instruments, Inc., Gathersburg, MD). Zones of inhibin activity are detected by bioassay.

[0082] Inhibin protein containing the  $\beta_B$  chain is further purified free of inhibin containing the  $\beta_A$  species, if desired, by two more RP-HPLC steps. The first step uses a 1 x 25 cm Vydac 5- $\mu$ m-particle-size C4 column and a trifluoroacetic acid (TFA) buffer system and the second step employs a 1 x 25 cm Vydac 5- $\mu$ m-particle-size Phenyl column and the TEAP buffer system. In the TFA system, buffer A contains 1 ml trifluoroacetic acid in 999 ml water and buffer B is 1 ml trifluoroacetic acid in 199 ml water and 800 ml acetonitrile. The two inhibin species elute separately. Inhibin accumulated from a few batches was concentrated by RP-HPLC using a 0.46 x 25 cm Aquapore RF-300 10  $\mu$ m-particle-size column (Brownlee Labs., Santa Clara, CA.) and the TFA buffer system. Ordinarily, however, this purification step will not be used with cell culture supernatants from transformants with DNA encoding only the  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains.

[0083] Inhibin, activin, prodomain sequences or their variants are administered in the form of pharmaceutically acceptable nontoxic salts, such as acid addition salts or metal complexes e.g., with zinc, iron or the like (which are considered as salts for purposes of this application). Illustrative of such acid addition salts are hydrochloride, hydrobromide, sulphate, phosphate, maleate, acetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate and the like. Intravenous administration in isotonic saline, phosphate buffer solutions or the like is suitable.

[0084] The polypeptide herein should be administered under the guidance of a physician, and pharmaceutical compositions will usually contain an effective amount of the peptide in conjunction with a conventional, pharmaceutically-acceptable carrier. The dosage will vary depending upon the specific purpose for which the protein is being administered, and dosage levels in the range of about 0.1 to about 1 milligram per Kg. of body weight may be used when inhibin is administered on a regular basis as a male contraceptive.

[0085] Inhibin, activin, prodomain sequences or their variants desirably are administered from an implantable or skin-adhesive sustained-release article. Examples of suitable systems include copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (U. Sidman et al., 1983, "Biopolymers" 22(1): 547-556), poly (2-hydroxyethyl-methacrylate) (R. Langer et al., 1981, "J. Biomed. Mater. Res." 15: 167-277 and R. Langer, 1982, "Chem. Tech." 12: 98-105) ethylene vinyl acetate (R. Langer et al., Id.), or poly-D-(-)-3- Hydroxybutyric acid (EP 133,988A). Such articles are implanted subcutaneously or are placed into contact with the skin or mucous membranes.

[0086] In order to simplify the Examples certain frequently occurring methods will be referenced by shorthand phrases

50

[0087] Plasmids are designated by a low case p preceded and/or followed by capital letters and/or numbers. The starting plasmids herein are commercially available, are publicly available on an unrestricted basis, or can be constructed from publicly available plasmids or DNA in accord with published procedures. In addition, other equivalent plasmids are known in the art and will be apparent to the ordinary artisan.

[0088] "Digestion" of DNA refers to catalytic cleavage of the DNA with an enzyme that acts only at certain locations in the DNA. Such enzymes are called restriction enzymes, and the sites for which each is specific is called a restriction site. "Partial" digestion refers to incomplete digestion by a restriction enzyme, i.e, conditions are chosen that result in

cleavage of some but not all of the sites for a given restriction endonuclease in a DNA substrate. The various restriction enzymes used herein are commercially available and their reaction conditions, cofactors and other requirements as established by the enzyme suppliers were used. Restriction enzymes commonly are designed by abbreviations composed of a capital letter followed by other letters and then, generally, a number representing the microorganism from which each restriction enzyme originally was obtained. In generally, about 1 µg of plasmid or DNA fragment is used with about 1 unit of enzyme in about 20 µl of buffer solution. Appropriate buffers and substrate amounts for particular restriction enzymes are specified by the manufacturer. Incubation times of about 1 hour at 37 °C are ordinarily used, but may vary in accordance with the supplier's instructions. After incubation, protein is removed by extraction with phenol and chloroform, and the digested nucleic acid is recovered from the aqueous fraction by precipitation with ethanol. Digestion with a restriction enzyme infrequently is followed with bacterial alkaline phosphatase hydrolysis of the terminal 5' phosphates to prevent the two restriction cleaved ends of a DNA fragment from "circularizing" or forming a closed loop that would impede insertion of another DNA fragment at the restriction site. Unless otherwise stated, digestion of plasmids is not followed by 5' terminal dephosphorylation. Procedures and reagents for dephosphorylation are conventional (T. Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning pp. 133-134).

[0089] "Recovery" or "isolation" of a given fragment of DNA from a restriction digest means separation of the digest on polyacrylamide gel electrophoresis, identification of the fragment of interest by comparison of its mobility versus that of market DNA fragments of known molecular weight, removal of the gel section containing the desired fragment, and separation of the gel from DNA. This procedure is known generally. For example, see R. Lawn et al., 1981, "Nucleic Acids Res." 9: 6103-6114, and D. Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057.

[0090] "Southern Analysis" is a method by which the presence of DNA sequences in a digest or DNA-containing composition is confirmed by hybridization to a known, labelled oligonucleotide or DNA fragment. For the purposes herein, unless otherwise provided, Southern analysis shall mean separation of digests on 1 percent agarose, denaturation and transfer to nitrocellulose by the method of E. Southern, 1975, "J. Mol. Biol." 98: 503-517, and hybridization as described by T. Maniatis et al., 1978, "Cell" 15: 687-701.

[0091] "Transformation" means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or chromosomal integrant. Unless otherwise provided, the method used herein for transformation of <u>E. coli</u> is the CaCl<sub>2</sub> method of Mandel et al., 1970, "J. Mol. Biol." 53: 154.

[0092] "Ligation" refers to the process of forming phosphodiester bonds between two double stranded nucleic acid fragments (T. Maniatis et al., Id., p. 146). Unless otherwise provided, ligation may be accomplished using known buffers and conditions with 10 units of T4 DNA ligase ("ligase") per 0.5 µg of approximately equimolar amounts of the DNA fragments to be ligated.

[0093] "Preparation" of DNA from transformants means isolating plasmid DNA from microbial culture. Unless otherwise provided, the alkaline/SDS method of Maniatis et al., ld. p. 90., may be used.

[0094] "Oligonucleotides" are short length single or double stranded polydeoxynucleotides which are chemically synthesized by known methods and then purified on polyacrylamide gels.

#### EXAMPLE 1

35

#### Isolation of Cloned Inhibin α-Subunit cDNAs

[0095] The strategy for identification of clones containing coding sequences for the porcine inhibin subunits was based on the "long-probe" approach, successful in some previous instances (Anderson et al., 1983, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 80:6836-6842 and Ullrich et al., 1984, "Nature" 309:418-425). Briefly, a high-complexity cDNA library constructed in \(\lambda\)gt10 and derived from porcine ovarian mRNA by oligo-dT-primed cDNA synthesis was screened with a single 64-base-long synthetic oligodeoxynucleotide directed against the N-terminal amino acid sequence of the αchain of porcine inhibin. It was found that the library is to be prepared from fresh ovarian tissue because the inhibin chain mRNA was apparently quite labile. Approximately 1 in 2,000 plaques hybridized with this probe, and sequence analysis of several hybridizing cloned cDNAs confirmed correct probe identification. This analysis revealed that none of the characterized cDNAs contained sufficient sequence information to predict the complete structure of the α-chain precursor protein. Rather than analyzing more clones from the same cDNA library, a second library was constructed by 3' extension on ovarian mRNA of a synthetic oligodeoxynucleotide complementary to a sequenced region encoding  $\alpha$  precursor residues 60-64 (Fig. 1A). This library was screened with a suitable restriction fragment from a previously analyzed cDNA and yielded several isolates which specified the remainder of the DNA sequences encoding the Nterminal region of the α precursor. Completeness of the coding sequence was judged from the presence of a long reading frame which specifies the porcine α-chain peptide sequence and starts with a methionine codon preceded by an in-frame stop codon and followed by a hydrophobic sequence bearing the hallmarks of a signal peptide. The full sequences for the precursor protein and its cDNA are shown in Fig. 1B. The complete protein including signal peptide has an Mr of ~40K consisting of 364 amino acids, of which the C-terminal 134 (M, ~14.5K) constitute the porcine inhibin

 $\alpha$ -chain. There are several Arg-Arg sequences in the proregion of the precursor, one of them directly preceding the  $\alpha$  subunit. We believe that this latter pair of basic residues is the processing site for the proteolytic release of the  $\alpha$  peptide. The deduced precursor sequence predicts two N-linked glycosylation sites, one within the  $\alpha$  chain proper. [0096] In addition to the coding region, the cDNA sequence contains a 3'-untranslated sequence of 167 nucleotides, including the canonical AATAAA polyadenylation signal, and a 5'-untranslated region, the proper length of which is presently unknown.

[0097] The detailed method was as follows:

15

20

25

45

50

[0098] Polyadenylated mRNA was prepared from freshly frozen porcine ovaries (Kaplan et al., "J. Biochem." 183: 181-184) An oligo-dT-primed cDNA library of ~6x10<sup>6</sup> clones in λgt10 (Huynh et al., 1984, <u>DNA Cloning Techniques.</u>, Ed. D. Clover) was prepared form 5 μg polyA+ mRNA as described by Wood et al., "Nature" 312: 330-337 (1984), except that the EcoRI adaptors used had the sequence

# 5'-AATTCACTCGAGACGC-3' 3'-GTGAGCTCTGCG-5'P.

[0099] Approximately 1 x 106 unamplified cDNA clones were screened with 5 α-subunit oligonucleotide

# 5'-ACCGCCCTTTGCCTTGGCCTTGGTCCCCTGCTGCTCTGAGACTGCTGCAGAGACCTCCTGAGG-3',

based on the amino acid sequence underlined in Fig. 1B. Hybridization was carried out with the phosphorylated <sup>32</sup>P-labelled probe in 5xSSC, 40% formamide at 37°C. Filters were washed at 50°C with 1xSSC, 0.1% SDS. Approximately 500 hybridization positive clones were obtained, twelve of which were purified and examined for insert size. The EcoR1 inserts of five of these (λPIN-α2, -α5A, -α5, -α9, -α10) were subcloned into M13 derivatives (Messing et al., 1981 "Nucl. Acids Res." 9:309-321) and sequenced by the dideoxy chain termination method of Sanger et al., "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 74:5463-5467 (1977). A specifically primed library was prepared by priming 5 μg of polyA+ mRNA with the oligonucleotide 5'-CCCCACAGCATGTCTT-3' (complementary to nucleotides 248-263) and subsequent cloning into λgt10. Approximately 2x10<sup>5</sup> clones of the 1x10<sup>6</sup> clones obtained were screened with the 5' 100bp EcoRI-BamHI fragment prepared from λPIN-α2. Twelve of the 170 hybridization positive clones obtained were purified and two (λPIN-S12s, -S4s) were sequenced by the dideoxy method. The complete nucleotide sequences of the α-subunit cDNAs were obtained by subcloning various restriction fragments with the different X isolates into the M13 phage derivatives. Compressions were resolved by the use of deoxyinosine mixes in combination with the E. coli single stranded binding protein (Pharmacia).

#### Isolation of Cloned Inhibin β Subunit cDNAS

[0100] The cDNA sequences encoding the precursors of the inhibin  $\beta$  subunits were obtained from the same cDNA libraries used for the  $\alpha$  subunit. Overlapping cDNA clones were isolated by screening first with single long synthetic oligodeoxynucleotide probes based on the two N-terminal  $\beta$  subunit sequences and subsequently with suitable restriction fragments derived from characterized cDNA clones which served as probes for "walking" in both 5' and 3' directions (Fig. 2A).

[0101] In more detail, approximately  $2x10^5$  oligo-dT primed ovarian cDNA clones were screened with the 5' end labelled  $\beta_A$  oligonucleotide,

#### 5'-AAGAAGCAGTTCTTTGTGTCCTTCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGGATCATTGC-3'

based on the amino acid sequence of residues 321-339. Five hybridization positives were obtained, of which three proved to contain  $\beta_A$  coding sequences ( $\lambda$ PIN- $\beta$ A2, - $\beta_A$ 4, - $\beta_A$ 8). A 5' end 154 bp EcoRI-HindIII (nucleotides 158-297) fragment and a 3' end 213 bp EcoRI-Pst fragment (nucleotides 1679-1892) derived from  $\lambda$ PIN $\beta$ A2 were used to screen 2x106 oligo-dT primed cDNA clones and 2x105 clones from the  $\alpha$ -chain specifically primed library. Out of the sixteen clones analyzed in detail two were found to have longer 5' ends ( $\lambda$ PIN- $\beta_A$ 5s, - $\beta_A$ 22) and one clone  $\lambda$ PIN- $\beta_A$ 21 contained the entire 3'-untranslated region. Porcine inhibin  $\beta_B$  subunit cDNA clones were isolated by screening 2x105 clones from the specifically primed library with the  $\beta_B$  oligonucleotide

### S'-GGCCTGGAGTGTGATGGGAGAACCAACCTGTCCTGCCGCCAGGAATTTTTCATCGATTTCAGGCT-3'

which was based on the NH<sub>2</sub>-terminal sequence described in Fig. 1A. Positive clones were further screened with the oligonucleotide inosine probe 5'-AAITCTATIAAIAA<sup>T</sup> TG<sup>T</sup><sub>C</sub> -3' ("I" in this sequence stands for inosine), which covers all the possibilities in the non-coding strand for the amino acid sequence QQFFIDF. Two clones (λPINβ<sub>B</sub>-1s, -2s) were isolated and sequenced and found to code for the β<sub>B</sub> subunit. A 230 bp EcoRI-Sma (nucleotides 21-251) fragment was isolated from λPINβ<sub>B</sub>-I and used as a hybridization probe to screen 2x10<sup>6</sup> oligo-dT primed cDNA clones. Two positives were obtained (λPINβ<sub>B</sub>-3,4). The nucleotide sequence of these overlapping clones was used to construct the sequence shown. All sequences were obtained by subcloning specific fragments into M13 phage vectors (Messing et al., op cit.). The EcoRI restriction sites referred to above are all contained within the cDNA adaptor fragment, and do not refer to sequences present in the cDNA.

[0102] We noted that only very few clones from the oligo-dT-primed library (4 out of  $2x10^5$ ) hybridized with the synthetic probe for the  $\beta$ -subunit of inhibin A. Although most of these proved correct by DNA sequence analysis, none contained a full 3'-untranslated region, as judged by the absence of a polyA homopolymer at their 3' ends. Absence of polyA tails suggested the existence of a very long 3'-untranslated sequence in this mRNA species and/or structural region(s) which prove difficult to copy by the polymerases used for library construction. Unexpectedly, a higher abundance (~10-fold) of inhibin  $\beta_A$  subunit coding sequences was found in the cDNA library made by specific priming on  $\alpha$ -subunit mRNA. This library was screened with the synthetic probe for the  $\beta$ -chain of inhibin A on the subsequently refuted theory that the  $\alpha$  precursor mRNA might also encode the  $\beta$  subunit. The high abundance of inhibin  $\beta_A$  cDNA in this library was later traced to fortuitous complementarity of the specific  $\alpha$  chain primer to a region in the 3'-untranslated portion of the corresponding mRNA.

[0103] Only four cloned cDNAs encoding the  $\beta$  subunit of inhibin B were found in our libraries. The sequence information obtained from these clones failed to reveal the complete structure of the corresponding precursor protein and its cDNA. The sequences of cDNAs and deduced protein structures for the precursors of the  $\beta$  subunits are compared in Fig. 2B. The nucleotide sequence of inhibin  $\beta_A$  subunit cDNA is 3.6 kb in length and contains an open reading frame for a protein of 425 amino acids (Mr ~46K), the C-terminal 116 residues of which represent the  $\beta$  subunit proper (Mr ~13K). This reading frame begins with a methionine codon followed by a sequence that codes for a characteristic signal peptide, the true length of which is believed to be 29 residues. The encoded  $\beta$  subunit is preceded by a string of 5 arginines at which it is presumably proteolytically cleaved from the precursor. Similar to the  $\alpha$  subunit precursor, this  $\beta$  precursor contains several additional pairs of basic residues at which hitherto unknown biologically active peptide entities are believed to be released. It also contains one possible site of N-linked glycosylation in the proregion (Asn, residue 165).

[0104] The deduced protein sequence for the  $\beta$  subunit of inhibin B shows high homology with the  $\beta_A$  subunit sequence. 71 amino acid residues are identical and most changes are conservative in nature. Sequence homology, although of a lesser degree, is also found in the proregion of both  $\beta$  subunit precursors. Interestingly, an extremely purine-rich sequence rarely seen in coding regions but present in the cDNA encoding the inhibin  $\beta_A$  precursor and resulting in a curious amino acid sequence is not found in the cDNA which codes for the homologous  $\beta_B$  precursor. This results in a gap of 22 amino acid residues from the  $\beta_B$  precursor of inhibin when protein sequences are aligned for maximal homology. Such alignment also brings about a perfect match in the cysteine positions of both precursors (see Fig. 2B).

#### Northern Analysis of α and chain Precursor mRNAS

35

45

[0105] Ovarian total and polyadenylated RNAs were analyzed by the Northern procedure using the sequenced cD-NAs as probes to assess size and relative abundance of the mRNAs which encode the peptide subunits  $\alpha$  and  $\beta$  and  $\beta_B$  of the heterodimeric inhibin molecule. Polyadenylated mRNA (2  $\mu$ g: lanes a, b, c, and f; 8  $\mu$ g: lane d) and total RNA (10  $\mu$ g: lanes e and g) were electrophoresed into a formaldehyde 1.2% agarose gel and blotted onto nitro-cellulose filters. The following <sup>32</sup>P-labelled cDNA fragments were used as hybridization probes under stringent conditions. Lane a: 240 bp EcoRI-Smal (nucleotides 134-371) from  $\alpha$  subunit cDNA; b: 154 pb EcoRI-HindIII (nucleotides 158-297) from  $\beta_A$  subunit cDNA; c: 230 bp EcoRI-Sma (nucleotides 21-251) from  $\beta_B$  subunit cDNA; d and e: EcoRI insert of  $\lambda$ PIN- $\alpha$ 2; f and g: EcoRI insert of  $\lambda$ PIN- $\beta_A$ 5. Filters were washed for 2 hours with 3 changes of 0.1xSSC, 0.1% SDS at 60°C.

[0106] Analysis showed (Fig. 3) that  $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs are of different size and abundance, as indicated by results obtained from cDNA cloning. From their respective band intensities the  $\alpha$  precursor mRNA is estimated to be at least of 10-fold higher abundance than the mRNA for the  $\beta_B$  precursor, and approximately 20-fold higher than the mRNA for the  $\beta_B$  precursor.

[0107] Using ribosomal RNAs as size standards, the  $\alpha$  precursor mRNA, which is a single species, is ~1500 nucleotides in length, a size in good agreement with the cloned cDNA sequence (Fig. 1B).  $\beta_A$  precursor mRNA sequences are represented by two main species of ~4.5 and ~7.2 kb in length. The relatively higher intensity of both species in polyadenylated than total RNA suggests that the 4.5 kb species does not represent 28S RNA which hybridized to the cDNA probe. Thus, the  $\beta$  precursor cDNA sequences shown in Fig. 2B are thought to represent the 4.5 kb mRNA, suggesting that the 5' untranslated region for the  $\beta_A$  mRNA is approximately 900 nucleotides long. The  $\beta_B$  precursor is encoded on one mRNA, of approximately 4.5 kb in size, which is present at roughly half the level of the two  $\beta_A$  mRNAs. Since the two  $\beta$  mRNAs are closely related, one can predict that both mRNAs have a similar structure and thus the  $\beta_B$  mRNA presumably possesses a long 5' and 3' untranslated region equivalent to that shown for the  $\beta_A$  mRNA. Choice of a different polyadenylation signal might explain the existence of the 7.2 kb species.

#### Homology To Transforming Growth Factor-B

[0108] The mature  $\alpha$  and  $\beta$  inhibin subunits contain seven and nine cysteine residues respectively. Upon alignment of the cysteine residues it is apparent that the two subunits share a similar cysteine distribution and some sequence homology exists around these residues (Fig. 4), suggesting that both types of subunits derive from one ancestral gene. Surprisingly, significant homology was found between the  $\beta$  chain and the primary structure of human TGF- $\beta$  recently determined. As outlined in Fig. 4, both peptides are of nearly equal length (inhibin  $\beta_A$  subunit, 116,  $\beta_B$  subunit 115; TGFS, 116 residues) and show a strikingly similar distribution of their nine cysteine residues. Using this cysteine "skeleton" for alignment, the  $\beta_A$  and TGF- $\beta$  sequences have an additional 31 residues in identical positions and show conservative changes in nine homologous places. Similar high homologies are seen upon comparison of the  $\beta_B$  and  $\beta$ -TGF. Some gaps were introduced for better alignment (Fig. 4). The overall homology reaches 35%, but approaches 60% in certain sections (cf. porcine inhibin  $\beta_A$  chain residues 11-45 and TGF residues 15-49), a very high degree of homology considering the difference in species. Interestingly, this homology extends beyond the termination codon for protein synthesis in the respective cDNAs. Thus, the cDNAs for TGF- $\beta$  and both inhibin  $\beta$  subunits contain a highly G and C rich sequence in this region, and they also possess unusually long 5' and 3' untranslated regions.

[0109] One can discount the suggestion that the  $\beta$  subunit of inhibin is the porcine equivalent of human TGF- $\beta$ , since there is almost absolute homology between human and murine  $\beta$ -TGFs. These findings strongly indicate that both inhibin subunits and TGF- $\beta$  have a common ancestor and belong to one gene family. All three peptides are derived from similarly-sized precursors ( $M_r$  ~40K) where they occupy the C-terminal 110 or so residues and are released by proteolytic cleavage at pairs of arginines. They form homo- or heterodimers, and subunits in the biologically active complex are linked by disulfide bridges. However, there is little sequence homology between TGF- $\beta$  and the  $\beta$  subunits in the pro parts of their precursors, although the regions comprising the odd residues which precede the  $\beta$  subunit and TGF peptides display limited but significant sequence relatedness.

#### EXAMPLE 2

35

45

50

55

10

#### Recombinant Synthesis of Porcine Inhibin

<sup>0</sup> **[0110]** The plasmid used for recombinant synthesis of porcine inhibin was pSVE-PαB<sub>A</sub>Inh-DHFR. The procedure to construct this plasmid is shown in Fig. 5. This plasmid was constructed as follows:

pHBS348-E (EP 0073656A) was partially digested with <u>Eco</u>RI, blunted with <u>E. coli</u> DNA polymerase I (Klenow fragment) and the four dNTPs, ligated and the ligation mixture was transformed into <u>E. coli</u> 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmids were screened for the loss of the <u>Eco</u>RI site preceding the SV40 early promoter. A plasmid having the site deleted is referred to as pHBS348-EII.

pHBS348-EII was digested with <u>EcoRI</u> and <u>EcoRI</u> to produce two fragments, fragment I containing the SV40 early promoter, pmL-Amp' sequences and the HBsAg 3' untranslated region and fragment 2 containing the HBsAg (hepatitis B antigen) coding sequences.

 $\lambda PIN\beta_A S_S$  containing the coding region for the porcine inhibin  $\beta_A$  subunit was digested with <u>EcoRI</u> and <u>Smal</u> and the 1335 bp fragment (fragment 3) containing the  $\beta_A$  coding region recovered by polyacrylamide gel electrophoresis. Fragment I, recovered by agarose gel electrophoresis, was ligated to fragment 3 and the ligation mixture transformed into <u>E. coli</u> strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmid DNA was prepared from transformants and checked by restriction analysis for the presence of the correct DNA fragments. This plasmid is referred to as pSVE-p $\beta_A$ Inh.

pHBS348-E (EP 0073656A) was partially digested with <u>Eco</u>RI, blunted with <u>E. coli</u> DNA polymerase I (Klenow fragment) and the four dNTPs, ligated to the synthetic oligonucleotide 5' GGTCGACC-3' containing the <u>Sall</u> rec-

ognition site. The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmids were screened for the presence of the extra <u>Sail</u> restriction site. Plasmid DNA is prepared from this construction (pHBS348-ESall).

λΡΙΝα-12s and λΡΙΝα-2 were digested with <u>Eco</u>RI and <u>Bam</u>HI. A 104 bp<u>Eco</u>RI-BamHI fragment from λΡΙΝα-12s containing the 5' coding region and a 1246 bp <u>Eco</u>RI-<u>Bam</u>HI fragment from λΡΙΝα-2 containing the middle and 3' coding region were recovered and ligated together. The ligation mixture was digested with <u>Eco</u>RI, the enzyme heat denatured, and the mixture ligated to <u>Eco</u>RI-digested pUC9 (BRL). Recombinants were selected and confirmed by restriction analysis. DNA was prepared from the correct plasmid (pPINα).

5

10

15

20

25

30

35

50

pPINα, containing the complete coding region for porcine α-inhibin was digested with Ncol and EcoRI, filled in by Pol(I)K in the presence of 4dNTP's, the 1280 bp fragment (fragment 4) was recovered by gel electrophoresis. pHBS348-ESall was digested with SstII and HindIII, filled in by Pol(I)K in the presence of 4dNTP's, and fragment 5 containing the PML-Amp' region, SV40 early promoter and HBsAg 3' untranslated region was recovered by gel electrophoresis. Fragments 4 and 5 were ligated together and the ligation mixture used to transform E. coli 294 (ATCC 31446). Recombinants were selected by growing on Ampicillin media plates. The desired recombinant is called pSVE-PαInh.

pHBS348-ESall was digested with <u>Sall</u> and <u>HindIII</u> and fragment 6 containing the pML-Amp', and SV40 early promoter was recovered by gel electrophoresis. pFD II (EP 117,060A) was digested with <u>Sall</u> and <u>HindIII</u> and fragment 7 was recovered which contains the normal mouse DHFR gene fused to the HBsAg 3' untranslated region. Fragments 6 and 7 were ligated, and the ligation mixture transformed into <u>E. coli</u> strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture was plated on ampicillin media plates and resistant colonies selected. Plasmid DNA was prepared from transformants and checked by restriction analysis for the presence of the correct DNA fragments. This construction is referred to as pFDII-Sal1.

pSVE-P $\alpha$ Inh was digested with <u>Sal</u>I and fragment 8 was recovered which contains the SV40 early promoter and the  $\alpha$ -inhibin coding region fused to the HBsAg 3'-untranslated region. pFDII-SalI was digested with SalI and fragment 9 containing the SV40 early promoter and the mouse DHFR coding region linked to the HBsAg 3'-untranslated region was recovered. PSVE- $\beta_A$ Inh was linearized by <u>SalI</u> digestion and ligated to fragments 8 and 9 in a three part ligation. The ligation mixture was transformed into <u>E</u>. <u>coli</u> strain 294 (ATCC 31446). The transformed culture is plated on ampcillin media plates and resistant colonies selected. Transformants were screened for the presence of fragments 8 and 9 in the correct orientation such that transcription from the three SV40 early promoters will proceed in the same direction. This final plasmid is designated pSVE- $\alpha\beta_A$ Inh-DHFR.

Plasmid pSVE-Pαβ<sub>A</sub>Inh-DHFR was transfected into DHFR deficient CHO cells (Urlaub and Chasin, 1980, PNAS 77,4216-4220). However, any DHFR- mammalian host cell is suitable for use with this plasmid. Alternatively, any mammalian host cell is useful when the host cell is cotransformed with a plasmid encoding neomycin resistance, and transformants identified by their ability to grow in neomycin-containing medium.

[0111] The transfected CHO cells were selected by culturing in 15 HGT- medium. The cells were allowed to grow to confluency in 15cm diameter plates. The cells thereafter were cultured in serum free medium for 48 hours prior to harvest. 50ml of supernatant medium was lyophilized after the addition of 100mg human serum albumin. The residue was redissolved in 3ml 1% fetal bovine serum in HDMEM (GIBCO Laboratories, Santa Clara, CA), filtered through a Millex-GS 0.22mM filter (Millipore Corp., Bedford, MA) and assayed in duplicate.

[0112] The inhibin hormonal activity in the transformant supernatants was determined by an in vitro bioassay using rat anterior pituitary monolayer culture, Vale, W. et al. Endocrinology, 91, 562-572 (1972). In brief, 21-day-old female rat anterior pituitaries were collected, enzymatically dispersed and plated in 10% fetal bovine serum in HDMEM (GIBCO Laboratories, Santa Clara, CA) into 24-well tissue culture plates (Falcon Plastic, Oxnard, CA) on day 1. On day 2, the medium was changed to 1% fetal bovine serum in HDMEM, and the transformant medium sample was added. Incubation was continued for another 48 hours. The monolayer medium was then harvested, and the LH and FSH contents were determined by radioimmunoassay (RIA) using materials provided by The Pituitary Hormone Program of NIADD-KD. In this assay, the inhibin-containing CHO cell culture inhibits the basal release of FSH but not LH, as compared to control pituitary cells that received the incubation medium only. The amount of porcine inhibin detected in transformant supernatants was 20 ng/ml and exhibited a dose response curve parallel to that obtained with pure porcine ovarian inhibin.

[0113] Immunological cross-reactivity is assayed by a sandwich-type radioimmunoassay. Rabbit antisera are raised against purified porcine follicular inhibin by s.c. immunization of rabbits with the porcine inhibin in Freund's complete adjuvant. The presence of anti-inhibin in the antiserum is detected by incubation of the antiserum with purified porcine inhibin and assaying for the formation of an immune complex by conventional techniques, e.g. gel filtration. An aliquot of the antisera is coated onto goat-anti-rabbit IgG precoated polystyrene test tubes. The recombinant culture supernatant or extract is diluted into phosphate buffered saline and added to the coated tubes, incubated overnight and washed. Another aliquot of the rabbit antiserum is added to the test tubes, incubated and washed. Radioiodinated goat

antirabbit IgG is added to the tubes, incubated and unbound goat antiserum removed by washing. The recombinant produced inhibin cross-reacts with the rabbit antiserum, as evidenced by bound counts on the test tubes which exceed those of controls incubated with culture medium or extracts from untransformed host cells.

#### 5 EXAMPLE 3

25

35

50

Construction of Human Inhibin Vector and Expression of Human Inhibin in Recombinant Cell Culture-I

[0114] Expression of human inhibin  $\alpha\beta_A$  facilitated by the discovery that the mature porcine and human  $\beta_A$  chains are identical. Thus, construction of a vector for the expression of human inhibin can proceed from plasmid PSVE- $\beta_A$ -Inh from Example 1, which contains the porcine  $\beta_A$ -encoding cDNA.

[0115] A  $\lambda$ gt 10 library of human ovarian cDNA made from 10  $\mu$ g of ovarian mRNA was subjected to Southern analysis using radiophosphate labelled porcine cDNA encoding  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  chains.  $\lambda$ HIN $\alpha$ -2 was identified as containing coding regions for the human  $\alpha$  inhibin chain. The prevalence of hybridizing clones in the case of human  $\alpha$  inhibin was considerably less than that found for porcine  $\alpha$  inhibin, on the order of 1 in 100,000 human clones hybridized to the 685 bp Smal fragment of the porcine cDNA for  $\alpha$ Inh. The  $\beta$  chain clones were also rare, with the  $\beta_B$  clones being present at about 3 times the level of  $\beta_A$  (1 and 3 out of about 1,000,000 clones, respectively). None of the  $\beta$  chain clones were full length. They were supplemented with a primed cDNA library and assembled generally as described above for the porcine cDNA. The  $\lambda$  inserts were recovered by EcoR1 digestion.

[0116] Plasmids pHINα-2 is digested with Ncol and Smal, and the 1049 bp 15 fragment (fragment 10) is recovered by gel electrophoresis. pPinα (Example 2) is digested with EcoRI and PvuII. The 98 bp fragment (fragment 11) is recovered by gel electrophoresis. Fragments 10 and 11 are ligated to adaptor I

## 5'-CIGCICICITGCTGTTGGCCCCACGGAGTGGGCATGGCTGCCAGGGCCCGGAGCTGGACC-3',

in combination with adaptor II which is the complement of adaptor I. The resulting 1208 bp fragment (fragment 12) is treated with Klenow fragment of Pol(I) and the 4 dNTP's and ligated to pHBS348-ESall which has been restricted with HindIII and SacII and blunt-ended as described in Example 1. Alternatively, pPin $\alpha$  was digested with EcoRI and HpaII with the fragment encoding upstream from the HpaII site (that is, the first 21 residues of the porcine sequence) being recovered. The adaptor used in this alternative approach was

# 5'CGGAGCTCGACC 3' 3' CTCGAGCTGG 5'.

[0117] A plasmid pSVE-H $\alpha$ Inh having the correct orientation of fragment 12 is identified by sequence analysis of transformants. This construction (pSVE-H $\alpha$ Inh) thus contains the first 24 residues of the porcine signal sequence with the remainder being prepro human inhibin. Plasmid pSVE-H $\alpha$ Inh is digested with <u>Sal</u>I. The fragment containing the SV40 promoter and human inhibin sequence is ligated to fragment 9 and <u>Sal</u>I digested pSVE- $\beta$ <sub>A</sub>Inh (Example 2). This final plasmid designated pSVE-h $\alpha$ <sub>B</sub><sub>A</sub>Inh-DHFR1 is transfected into DHFR-deficient CHO cells and selected as described in Example 2. The culture supernatant contains hormonally active human inhibin.

#### **EXAMPLE 4**

Construction of Human Inhibin Vector and Expression of Human Inhibin in Recombinant Cell Culture-II

[0118] This example is similar to Example 3 except that the pro sequence of human inhibin  $\beta_B$  was employed in the place of the porcine  $\beta_B$  prepro domain.

[0119] The lambda gt10 library of Example 3 yielded  $\lambda HINo2$ , as described in example 3, together with  $\lambda HIN\beta_A$ -5 and -14. The latter two phage were employed to construct the full length  $\beta_A$  coding cDNA by ligating the 311 bp  $\underline{Eco}$ RI- $\underline{Hind}III$  fragment (fragment 13) of  $\lambda HIN\beta_A$ -5 to the 1101 bp  $\underline{Hind}III$ - $\underline{Hpa}I$  fragment (fragment 14) of  $\lambda HIN\beta_A$ -14 and ligating this mixture in an  $\underline{Eco}$ R1- $\underline{Sma}I$  digested mp18 vector (Biolabs). Clones were selected and screened for the appropriate sized insert. An mp18 vector containing the correct insert was treated with DNA polymerase(I) and the four dNTPs in order to render it double stranded, and thereafter digested with XbaI (which cleaves in the mp18 polylinker

sequence), blunted with DNA polymerase I and the four dNTPs, and digested with  $\underline{\text{Eco}}$ R1. A 1320 bp fragment (fragment 15) was ligated to the  $\underline{\text{Eco}}$ R1- $\underline{\text{Eco}}$ RV fragment 1 from Example 2. This ligation mixture was used to transform  $\underline{\text{E. coli}}$  294 cells. Clones were screened by Southern Hybridization and confirmed by restriction analysis. The clone containing the hInh $\beta_A$  coding sequence was designated pSVE-hum $\beta_A$ Inh. A plasmid containing the human  $\beta_A$  coding sequences and the human  $\alpha$ -inhibin sequences together with the DHFR gene is constructed from plasmids pSVE-hum $\beta_A$ Inh, pSVE-H $\alpha$ Inh and pFDIISall as outlined above. Specifically, the  $\underline{\text{Sal}}$  fragments from pSVE-H $\alpha$ Inh and pFDIISall which contain the human alpha inhibin and the DHFR genes were ligated with  $\underline{\text{Sall}}$  digested pSVE-hum $\beta_A$ Inh and a clone containing all three genes was identified. This plasmid, designated pSVE-hum $\alpha_A$ Inh-DHFR2 was transfected into DHFR- CHO cells and selected by culture in ght medium. 24 clones were picked, grown to confluency in ght medium under conditions conventional for CHO cells for two days, allowed to rest for 2 more days and thereafter the culture media were assayed for inhibin and activin activity using the rat pituitary cell assay described above. 4 clones were found to secrete significant levels of human  $\alpha\beta_A$  inhibin (h $\alpha\beta_A$ -8, 12, 14, and 18). The levels in the culture medium for each clone were, respectively, 125, 125, 200 and 250 ng/ml. Another clone (h $\alpha\beta_A$ -11) produced activin as the  $\beta_A\beta_A$  homodimer, but no detectable inhibin, as determined by biological activity and the lack of  $\alpha$  chain immunoreactivity in the culture medium for this clone. Clone h $\alpha\beta_A$ -16 secreted only  $\alpha$  chain and was devoid of activin or inhibin activity.

#### **EXAMPLE 5**

10

15

20

35

45

50

55

#### Recombinant Expression of Human Activin

[0120] As reported by Vale  $\underline{et}$   $\underline{al}$ . (Id.) and Ling  $\underline{et}$   $\underline{al}$ . (Id.), homodimers and heterodimers of the  $\beta$  chains A and/or B have the opposite effect of inhibin on the pituitary, introducing rather than inhibiting FSH secretion. These proteins, collectively termed activin, are made in  $\alpha$  and  $\beta$  chain cotransformants as described in Example 4. However, somewhat less screening for an appropriate transformant is needed if the initial transfection is conducted with a vector or vectors that do not contain the  $\alpha$  chain gene. A suitable vector is readily constructed from the above-described vectors by excising the  $\alpha$  chain gene. Plasmid pSVE-hum $\beta_A$ Inh from Example 4 is digested with Sall and ligated to fragment 9 (Example 2) containing the DHFR gene. The ligation mixture was used to transfect  $\underline{E}$ . coli 294 cells and colonies selected on the basis of failure to hybridize to the  $\alpha$  chain sequence but which did hybridize to the  $\beta$  chain DNA. A clone pSVE-hum $\beta_A$ Inh-DHFR was identified from which the  $\alpha$  chain DNA has been deleted. This clone is transfected into DHFR- CHO cells as described above. Transformants are identified that secrete activin into the culture medium. Similarly, an expression vector containing a  $\beta_B$  coding sequence (reconstituted by ligating DNA encoding the first 34 amino acids of human  $\beta_A$  to the remaining coding sequence of the human  $\beta_B$  chain) is readily constructed and contransfected with pSVE-hum $\beta_A$ Inh-DHFR to produce the heterodimer. The reconstructed human  $\beta_B$  gene also is used in the forgoing plasmids in order to produce  $\alpha\beta_B$ -inhibin which,

#### Claims

### Claims for the following Contracting States : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

1. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence but excluding bovine inhibin α chain and the partial bovine inhibin β chain of the sequence

Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser

15 and

5

10

25

30

35

40

- 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 2. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
  - A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an inhibin β chain, or an amino acid sequence variant thereof, other than native human or porcine β<sub>A</sub> or the partial bovine inhibin β chain specified in claim 1.
  - 4. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>325</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]-Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>-Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gin]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
  - 5. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→IIe or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; IIe<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; IIe<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or IIe; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
  - 6. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the ihhibin  $\alpha$  chain and/or  $\beta$  chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin or a  $\beta$  chain dimer from the culture medium.
  - 7. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
- 8. The method of any preceding claim wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\alpha$  chain or an inhibin  $\beta$  chain.
  - 9. The method of claim 8 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of both the inhibin  $\alpha$  chain and an inhibin  $\beta$  chain.
- 10. The method of any one of claims 1 to 6, 8 or 9 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
  - 11. The method of claim 6 wherein the promoter is a viral promoter.

12. The method of claim 11 wherein the promoter is an SV40 promoter.

10

15

20

25

30

35

45

- 13. The method of any preceding claim wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
- 5 14. The method of any of claims 1 to 7 or 10 to 12 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin β chain and a mature β-chain dimer is recovered free of the α -chain.
  - 15. The method of claim 10 or 13 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain arid the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
  - 16. A composition comprising human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chains being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, but excluding bovine inhibin α chain and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
  - 17. A composition according to Claim 16 wherein the sequences of said α and β chains are selected from those depicted in Fig 1 B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
    - 18. A composition according to claim 16 wherein said variants are selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>-Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln] Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
    - 19. A composition according to claim 16 including a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain.
- 20. A composition comprising a prodomain of human or porcine α or β<sub>B</sub> inhibin as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β<sub>B</sub> chain), Fig 6A (human α chain), and Fig 9 (human β<sub>B</sub> chain) unassociated with native glycosylation.
  - 21. A composition comprising a homodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> or β<sub>B</sub> chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
- 22. A composition according to Claim 21 which is a homodimer of mature human or porcine β<sub>B</sub> chains or a said amino acid sequence variant thereof.
  - 23. A composition comprising a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> with mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.

24. Non-chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence excluding bovine inhibin α chain and the partial bovine inhibin β chain of the sequence

Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asp-Ile-Cys-Cys-Lys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser

and

5

10

15

20

25

30

- 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 25. The DNA of claim 24 encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
- 26. The DNA of claim 24 which encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]-Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]-Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 27. The DNA of claim 24 which encodes a variant of a human β inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or lie; or comparable modified human β<sub>B</sub> chain
  - 28. The DNA of any of claims 24 to 27 which is free of intervening untranslated sequences.
  - 29. The DNA of any one of claims 24 to 28 which is labelled with a detectable moiety.
- 30. A replicable vector comprising a DNA of any of claims 21 to 27.
  - 31. The vector of claim 30 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.
- 55 32. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 33. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.

34. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, excluding bovine inhibin α chain, and the partial bovine inhibin β chain of the sequence

and

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

- 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 35. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or an inhibin  $\beta$  chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
- 36. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]-Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A
- 37. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant of a human  $\beta_A$  inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>—lle or Leu; Gln<sub>297</sub>—Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>—Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>—Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>—Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>—Trp or Thr; His<sub>318</sub>—Lys; Ala<sub>319</sub>—Ser; Asn<sub>320</sub>—Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>—Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>—Tyr; His<sub>353</sub>—Asp; His<sub>353</sub>—Lys (a  $\beta_A/\beta_B$  hybrid); Phe<sub>356</sub>—Tyr; Val<sub>364</sub>—Phe; Val<sub>364</sub>—Leu; Tyr<sub>375</sub>—Thr; Tyr<sub>376</sub>—Trp; Asn<sub>389</sub>—Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>—Leu or Thr; Met<sub>390</sub>—Leu or Ser; Val<sub>392</sub>—Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human  $\beta_B$  chain
- 38. The cell of any of claims 34 to 37 which is a eukaryotic cell.
- 39. A cell-free composition that is free of mature α chain polypeptide containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 40. A cell-free composition containing
  - a) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_{\text{A}}$  chain prodomain sequence

|    | HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (Amino acids 1-40   |
|----|--|
| 5  | of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino  |
|    | acids 44-80 of Fig 8.),  |
| 10 | AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-   |
|    | RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino  |
| 15 | acids 83-185 of Fig 8), STWHVFPVSSSIQRLLD-   |
|    | QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),   |
| 20 | or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin $\beta_{\text{B}}$ chain prodomain sequence   |
| 25 | CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino acids   |
|    | 7-30 of Fig 9),  |
| 30 | HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-   |
|    | GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS   |
| 35 | (amino acids 33-145 of Fig 9),   |
|    | VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino   |
| 40 | acids 149 - 195 of Fig 9),   |
| 45 | LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids  |
|    | 198-241 of Fig 9),   |
| 50 | or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or c) a polypeptide free of the mature $\alpha$ chain amino acid sequence comprising the human inhibin $\alpha$ chain prodomain sequences |
| 55 | KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino  |
|    | acids 1 - 24 of Fig 6),  |

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA (amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

5

10

15

25

30

55

- 41. , A cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence, and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 20 42. The composition of claim 41 wherein the β chain is the β<sub>A</sub> chain and the composition is free of mature β<sub>A</sub> chain sequence.
  - 43. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
  - 44. The composition of claim 40 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
    - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
    - b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
- 35 45. The composition of any of claims 39 to 44 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
  - **46.** The composition of any of claims 39 to 45 which is sterile and wherein the polypeptide further comprises an immunogenic polypeptide.
- 47. The use of a composition of any of claims 39 to 46 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
  - 48. The composition of any of claims 39 to 46 wherein the polypeptide is conjugated to a detectable group.
- 45. The composition of claim 48 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
  - 50. The composition of any of claims 39 to 44, 48 or 49 which is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
- 50 51. The composition of any of claims 39 to 46, 48 or 49 further comprising a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

## Claims for the following Contracting State: LU

 A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human

 $\beta$  chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence but excluding bovine inhibin  $\alpha$  chain and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.

- 2. A method according to Claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 3. A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an inhibin  $\beta$  chain, or an amino acid sequence variant thereof, other than native human or porcine  $\beta_{\Delta}$ .
  - 4. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]lnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>322</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]-lnhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, wherein lnh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for lnhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding lnhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
- 30 6. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin α chain and/or β chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin or a β chain dimer from the culture medium.
  - 7. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
  - **8.** The method of any preceding claim wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin α chain or an inhibin β chain.
- 9. The method of claim 8 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of both the inhibin  $\alpha$  chain and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 10. The method of any one of claims 1 to 6, 8 or 9 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
- 11. The method of claim 6 wherein the promoter is a viral promoter.

5

15

20

35

- 12. The method of claim 11 wherein the promoter is an SV40 promoter.
- 13. The method of any preceding claim wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
- 14. The method of any of claims 1 to 7 or 10 to 12 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\beta$  chain and a mature  $\beta$ -chain dimer is recovered free of the  $\alpha$ -chain.
- 15. The method of claim 10 or 13 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
  - 16. A composition comprising human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chains being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig

6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, but excluding bovine inhibin  $\alpha$  chain and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.

17. A composition according to Claim 16 wherein the sequences of said α and β chains are selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

- 18. A composition according to claim 16 wherein said variants are selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα; [Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> or Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]Inhβ<sub>A</sub>; (Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln] Inhβ<sub>B</sub>, wherein Inh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 19. A composition according to claim 16 including a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>-Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain.
- 20. A composition comprising a prodomain of human or porcine α or β<sub>B</sub> inhibin as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β<sub>B</sub> chain), Fig 6A (human α chain), and Fig 9 (human β<sub>B</sub> chain) unassociated with native glycosylation.
- 21. A composition comprising a homodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> or β<sub>B</sub> chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin α chain.
- 22. A composition according to Claim 21 which is a homodimer of mature human or porcine  $\beta_B$  chains or a said amino acid sequence variant thereof.
- 23. A composition comprising a heterodimer of mature human or porcine inhibin  $\beta_A$  with mature human or porcine inhibin  $\beta_B$ , said chains being as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or of an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is free of the inhibin  $\alpha$  chain.
- 24. Non-chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence excluding bovine inhibin  $\alpha$  chain and 1) being cross reactive, with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of depicted sequence.
- 25. The DNA of claim 24 encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).

- 26. The DNA of claim 24 which encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives (Asn<sub>266</sub>→Gln]-lnhα;[Cys<sub>325</sub> or Cys<sub>324</sub>→Δ]lnhα; [Cys<sub>363</sub>→Δ]lnhα; [Lys<sub>321</sub> or Lys<sub>322</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His or Ser]lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> or Cys<sub>390</sub>→Δ]lnhβ<sub>A</sub>,[Lys<sub>411</sub>→Gln]lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> or Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]-lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, wherein Inn is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for Inhβ<sub>B</sub> are those used for the corresponding Inhβ<sub>A</sub> residue (see Fig. 2B); human inhibin β<sub>A</sub> chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human α chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 6A.
- 27. The DNA of claim 24 which encodes a variant of a human β inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>—lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub> →Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparable modified human β<sub>B</sub> chain
  - 28. The DNA of any of claims 24 to 27 which is free of intervening untranslated sequences.
  - 29. The DNA of any one of claims 24 to 28 which is labelled with a detectable moiety.
- 30. A replicable vector comprising a DNA of any of claims 21 to 27.

5

15

40

45

50

- 31. The vector of claim 30 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.
- 25 32. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 33. The vector of claim 30 or 31 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.
- 34. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence, excluding bovine inhibin α chain, and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
  - 35. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
  - 36. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant selected from: porcine inhibin derivatives  $(Asn_{266} \rightarrow Gln]lnh\alpha; [Cys_{325} \text{ or } Cys_{324} \rightarrow \Delta]lnh\alpha; [Cys_{361} \text{ or } Cys_{363} \rightarrow \Delta]lnh\alpha; [Lys_{321} \text{ or } Lys_{322} \rightarrow \Delta]lnh\beta_A; [Lys_{322} \rightarrow His \text{ or } Ser]lnh\beta_A; [Lys_{315} \rightarrow Arg; Val_{316} \rightarrow Thr] lnh\beta_A; [Cys_{388} \text{ or } Cys_{390} \rightarrow \Delta]-lnh\beta_A, [Lys_{411} \rightarrow Gln]lnh\beta_A; [Arg_{315} \rightarrow Lys; Val_{316} \rightarrow Thr]lnh\beta_B; [Cys_{319} \text{ or } Cys_{320} \rightarrow \Delta]lnh\beta_B; [Pro_{381} \text{ Gly}_{382} \rightarrow Pro \text{ Phe Gly}]lnh\beta_B; [Arg_{395} \rightarrow Gln]lnh\beta_B, wherein lnh is an abbreviation of inhibin and the residue numbers for lnh\beta_B are those used for the corresponding lnh\beta_A residue (see Fig. 2B); human inhibin <math>\beta_A$  chain variants having variations which are substitution or deletion at, or insertion next to, a residue selected from residues 293-297, 364-376 and 387-398 of the sequence depicted in Fig. 8; and variants of human  $\alpha$  chain which are greater than 90% homologous with the sequence depicted in Fig. 8
  - 37. A host cell according to claim 34 wherein the DNA encodes a variant of a human β<sub>A</sub> inhibin chain selected from Phe<sub>302</sub>→lle or Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp or Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr or Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr or Phe; lle<sub>311</sub>→Phe or Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp or Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr or His; Tyr<sub>321</sub>→Thr or Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His or Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu or Thr; Met<sub>390</sub>→Leu or Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr or Ile; or comparably modified human β<sub>B</sub> chain
  - 38. The cell of any of claims 34 to 37 which is a eukaryotic cell.

- 39. A cell-free composition that is free of mature  $\alpha$  chain polypeptide containing a human or porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain) or Fig 6A (human  $\alpha$  chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 40. A cell-free composition containing

5

10

15

20

25

40

45

50

55

a) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (Amino acids 1-40 of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8.),

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino
acids 83-185 of Fig 8), STWHVFPVSSSIQRLLD-

QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino acids

7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (aminc acids 149 - 195 of Fig 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids 198-241 of Fig 9),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or

c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain pro-

domain sequences

KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino

5

acids 1 - 24 of Fig 6).

10

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-

PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-

APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA

(amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

20

25

15

- 41. A cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence, and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 42. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.
- 30 43. The composition of claim 41 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
  - 44. The composition of claim 40 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:

35

40

45

- a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108: amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
- b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
- 45. The composition of any of claims 39 to 44 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
- **46.** The composition of any of claims 39 to 45 which is sterile and wherein the polypeptide further comprises an immunogenic polypeptide.
  - **47.** The use of a composition of any of claims 39 to 46 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
- 48. The composition of any of claims 39 to 46 wherein the polypeptide is conjugated to a detectable group.
  - 49. The composition of claim 48 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
  - **50.** The composition of any of claims 39 to 44, 48 or 49 which is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
  - 51. The composition of any of claims 39 to 46, 48 or 49 further comprising a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

#### Claims for the following Contracting State: GR

5

10

20

40

- 1. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross, reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 2. A method according to Claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- A method according to Claim 1 wherein the vector encodes an allelic variant of human or porcine inhibin α and/ or β chain.
  - 4. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin  $\alpha$  chain and/or  $\beta$  chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin  $\alpha$  chain, inhibin  $\beta$  chain, inhibin or a  $\beta$  chain dimer from the culture medium.
  - 5. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
- 6. The method of any one of the preceding claims wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\alpha$  chain or an inhibin  $\beta$  chain.
  - A method according to claim 6 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro forms of both the inhibin α chain and an inhibin β chain.
- 30 8. The method of any one of claim 1 to 4, 6 or 7 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
  - 9. The method of claim 4 wherein the promoter is a viral promoter.
- 15 10. The method of claim 9 wherein the promoter is an SV40 promoter.
  - 11. The method of any preceding claims wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
  - 12. The method of any of claims 1 to 5 or 8 to 10 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin β chain and a mature β-chain dimer is recovered free of the α-chain.
  - 13. The method of claim 8 or 11 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
- 45 14. A method according to Claim 4 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, amino acid sequences of said α and β chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
  - 15. A method according to Claim 14 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an  $\alpha$  and a  $\beta$  chain, the amino acid sequences of said  $\alpha$  and  $\beta$  chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 16. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a prodomain of human or porcine  $\alpha$  or  $\beta_B$  inhibin as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta_B$  chain), Fig 6A (human  $\alpha$  chain), and Fig 9

(human  $\beta_{\text{B}}$  chain) unassociated with native glycosylation.

5

15

20

25

30

35

40

- 17. A method according to Claim 4 wherein a  $\beta$  chain dimer is recovered which is a homodimer of mature human or porcine inhibin  $\beta_A$  or  $\beta_B$  chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin  $\alpha$  chain.
- 18. A method according to Claim 17 wherein a homodimer of mature human or porcine β<sub>B</sub> chains or a said amino acid sequence variant thereof is recovered.
  - 19. A method according to Claim 4 wherein a  $\beta$  chain dimer is recovered which is a heterodimer of mature human or porcine inhibin  $\beta_B$ , with mature human or porcine inhibin  $\beta_B$ , said chains being as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin  $\alpha$  chain.
  - 20. Non chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
  - 21. A DNA according to Claim 20 encoding a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence. is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 22. The DNA of claim 20 or 21 which is free of intervening untranslated sequences.
  - 23. The DNA of any one of Claims 20 to 22 which is labelled with a detectable moiety.
  - 24. A replicable vector comprising a DNA of claim 20 or 21.
  - 25. The vector of Claim 24 comprising a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains.
  - 26. The vector of claim 24 or 25 which contains DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain.
  - 27. The vector of claim 24 or 25 which contains DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain.
- 28. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a depicted sequence.
  - 29. A host cell according to Claim 28 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin  $\alpha$  and/or an inhibin  $\beta$  chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
  - 30. The cell of claim 28 or 29 which is a eukaryotic cell.
  - 31. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition, free of mature  $\alpha$

chain sequence, containing a human or porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain) or Fig 6A (human  $\alpha$  chain) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.

- 32. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing
  - a) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_{A}$  chain prodomain sequence

5

10

20

25

30

35

40

45

50

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino acids 1-

40 of Fig 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8).

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino acids 83-185 of Fig 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino acids 7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino acids 149 - 195 of Fig 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids 198-241 of Fig 9),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain prodomain sequences

KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV (amino acids

1 - 24 of Fig 6),

5

10

15

20

25

40

50

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-

GERA (amino acids 32 - 199 of Fig 6),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.

- 33. A method according to Claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing a human or porcine inhibin β chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion, or substitution of a said prodomain polypeptide of a sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raise against a polypeptide of a depicted sequence.
- 30 34. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.
  - 35. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
- **36.** The method of claim 32 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:
  - a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 111 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
  - b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.
  - 37. The method of any of claims 31 to 36 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.
- 38. The method of any one of claims 31 to 37 wherein the composition is sterile and further comprising coupling the polypeptide with an immunogenic polypeptide.
  - **39.** The use of a composition of any of claims 31 to 38 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
  - 40. The method of any of claims 31 to 38 further comprising conjugating the polypeptide to a detectable group.
  - 41. The method of claim 40 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
- 42. The method of any of claims 31 to 38, 40, or 41 wherein the composition is insolubilized by non-covalent absorption or covalent cross-linking to a water insoluble support.
  - 43. The method of any of claims 31 to 38 or 40 to 41 further comprising mixing the composition with a physiologically

acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

#### Claims for the following Contracting States: AT, ES

5

10

20

35

50

- 1. A method comprising culturing a host cell transformed with a vector which includes nucleic acid encoding a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine inhibin chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig is (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.
- 2. A method according to claim 1 wherein the nucleic acid encodes a human or porcine inhibin α chain and/or a human or porcine β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
  - 3. A method according to claim 1 wherein the vector encodes an allelic variant of human or porcine inhibin α and/or β chain.
  - 4. The method of any one of the preceding claims wherein the nucleic acid encoding the inhibin  $\alpha$  chain and/or  $\beta$  chain is operably linked to a promoter recognized by the host cell and including the further step of recovering inhibin  $\alpha$  chain, inhibin  $\beta$  chain, inhibin or a  $\beta$  chain dimer from the culture medium.
- 5. The method of any one of the preceding claims wherein the cell is a prokaryote.
  - 6. The method of any one of the preceding claims wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\alpha$  chain or an inhibin  $\beta$  chain.
- A method according to claim 6 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro forms of both the inhibin α chain and an inhibin β chain.
  - 8. The method of any one of claim 1 to 4, 6 or 7 wherein the cell is a cell from a multicellular organism and hormonally active inhibin is produced.
  - 9. The method of claim 4 wherein the promoter is a viral promoter.
  - 10. The method of claim 9 wherein the promoter is an SV40 promoter.
- 11. The method of any preceding claims wherein mature porcine or human inhibin is recovered.
  - 12. The method of any of claims 1 to 5 or 8 to 10 wherein the vector comprises nucleic acid encoding the prepro form of an inhibin  $\beta$  chain and a mature  $\beta$ -chain dimer is recovered free of the  $\alpha$ -chain.
- 45 13. The method of claim 8 or 11 wherein the β chain is the β<sub>A</sub> chain and the inhibin is present in a concentration greater than about 20 ng/ml in the culture medium.
  - 14. A method according to claim 4 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an α and a β chain, the amino acid sequences of said α and β chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains), and amino acid sequence variants by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, which variants are substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) are cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) have like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which composition is completely free of unidentified human or porcine proteins.
  - 15. A method according to claim 14 wherein the inhibin is human or porcine inhibin made up of an  $\alpha$  and a  $\beta$  chain, the amino acid sequences of said  $\alpha$  and chain being selected from those depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).

- 16. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a prodomain of human or porcine α or β<sub>B</sub> inhibin as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β<sub>B</sub> chain), Fig 6A (human α chain), and Fig 9 (human β<sub>B</sub> chain) unassociated with native glycosylation.
- 17. A method according to claim 4 wherein a β chain dimer is recovered which is a homodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>A</sub> or β<sub>B</sub> chains, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which dimer is free of the inhibin α chain.
  - 18. A method according to claim 17 wherein a homodimer of mature human or porcine β<sub>B</sub> chains or a said amino acid sequence variant thereof is recovered.
- 19. A method according to claim 4 wherein a β chain dimer is recovered which is a heterodimer of mature human or porcine inhibin β<sub>B</sub>, said chains being as depicted in Fig 2B (porcine β chains) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence, or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; which heterodimer is free of the inhibin α chain.
  - 20. A method for the production of non chromosomal DNA encoding a human or porcine inhibin α or a human or porcine inhibin β chain as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence; the method comprising chemical synthesis, screening mRNA from ovary, or screening genomic libraries of any cell.

25

30

45

- 21. A method according to claim 20 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin  $\alpha$  or a human or porcine inhibin  $\beta$  chain whose amino acid sequence is as depicted in Fig 1B (porcine  $\alpha$  chain), Fig 2B (porcine  $\beta$  chains), Fig 6A (human  $\alpha$  chain) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains).
- 35 22. The method of claim 20 or 21 wherein the non-chromosomal DNA is free of intervening untranslated sequences.
  - 23. The method of any one of claims 20. to 22 further comprising the step of labelling the non-chromosomal DNA with a detectable moiety.
- 40 24. A method for the production of a replicable vector, the method comprising inserting a DNA of claim 20 or 21 in a cloning vector.
  - 25. The method of claim 24 wherein the DNA is inserted into a vector which has a viral promoter operably linked to the DNA encoding the inhibin  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains thereby to produce an expression vector.
  - 26. The method of claim 24 or 25 wherein DNA encoding both an inhibin  $\alpha$  and an inhibin  $\beta$  chain is inserted into the vector
- 27. The method of claim 24 or 25 wherein DNA encoding an inhibin  $\beta$  chain but not the inhibin  $\alpha$  chain is inserted into the vector.
  - 28. A host cell transformed with a replicable vector comprising DNA encoding the human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a polypeptide of a said depicted sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a depicted sequence and 1) being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence; or 2) having like hormonal activity to a polypeptide of a depicted sequence.

- 29. A host cell according to claim 28 wherein the DNA encodes a human or porcine inhibin α and/or an inhibin β chain, the amino acid sequences of which are as depicted in Fig 1B (porcine α chain), Fig 2B (porcine β chains), Fig 6A (human α chain) and Figs 8 and 9 (human β chains).
- 5 30. The cell of claim 28 or 29 which is a eukaryotic cell.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

- 31. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition free of mature α chain sequences containing a human or porcine inhibin α chain prodomain polypeptide sequence as depicted in Fig 1B (porcine α chain) or Fig 6A (human α chain) or an amino acid sequence variant of a said prodomain sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 32. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing
  - a) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino acids 1-40 of Fig 8, PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (amino acids 44-80 of Fig 8).

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-TRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA, amino acids 83-185 of Fig 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino acids 188-230 of Fig 8),

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; b) a polypeptide comprising the human inhibin  $\beta_B$  chain prodomain sequence

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV, (amino

acids 7-30 of Fig 9),

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS (amino acids 33-145 of Fig 9),

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino acids 149 - 195 of Fig 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino acids 198-241 of Fig 9),

5

or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof; or c) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the human inhibin  $\alpha$  chain pro-

domain sequences

10

KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV (amino acids

1 - 24 of Fig 6),

15

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-

GERA (amino acids 32 - 199 of Fig 6),

25

30

20

- or naturally occurring mammalian amino acid sequence variants thereof.
- 33. A method according to claim 4 wherein the recovered inhibin chain is a cell-free composition containing a human or porcine inhibin  $\beta$  chain prodomain polypeptide of a sequence as depicted in Fig 2B (porcine  $\beta$  chains) and Figs 8 and 9 (human  $\beta$  chains) or an amino acid sequence variant by way of insertion, deletion or substitution of a said prodomain polypeptide of a sequence, the variant being substantially homologous with a polypeptide of a said sequence and being cross reactive with antibodies raised against a polypeptide of a depicted sequence.
- 34. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_A$  chain and the composition is free of mature  $\beta_A$  chain sequence.
- 35 35. The method of claim 33 wherein the  $\beta$  chain is the  $\beta_B$  chain and the composition is free of mature  $\beta_B$  chain sequence.
  - 36. The method of claim 32 wherein the variant is the corresponding porcine amino acid sequence, the composition containing:

40

- a) a polypeptide comprising the porcine inhibin  $\beta_A$  chain prodomain sequence depicted at: amino acids 28 to 58; amino acids 61 to 87; amino acids 90 to 108; amino acids 11 to 179; amino acids 182 to 213; amino acids 216 to 258; or amino acids 28 to 87 of Fig 2B; or
- b) a polypeptide free of the mature  $\alpha$  chain amino acid sequence comprising the porcine inhibin  $\alpha$  chain prodomain polypeptide sequences depicted at: amino acids 20 to 54; or amino acids 70 to 228 of Fig 1B.

45

50

37. The method of any of claims 31 to 36 wherein the polypeptide is unaccompanied by native glycosylation.

38. The method of any one of claims 31 to 37 wherein the composition is sterile and further comprising coupling the polypeptide to an immunogenic polypeptide.

- 39. The use of a polypeptide of any of claims 31 to 38 in the preparation of an antibody capable of binding said polypeptide.
- 40. The method of any of claims 31 to 38 further comprising conjugating the polypeptide to a detectable group.

- 41. The method of claim 40 wherein the group is an enzyme, fluorophore or radioisotope.
- 42. The method of any of claims 31 to 38, 40 or 41 wherein the composition is insolubilized by non-covalent absorption

or covalent cross-linking to a water insoluble support.

43. The method of any of claims 31 to 38 or 40 or. 41 further comprising mixing the composition with a physiologically acceptable implantable matrix for controlled release of the polypeptide into the tissues of an animal.

#### **Patentansprüche**

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

#### Patentanspruch für folgende Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette der Sequenz

und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.

- 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-a-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine Inhibin-β-Kette oder eine Aminosäuresequenzvariante davon mit Ausnahme der nativen menschlichen oder Schweine-β<sub>A</sub>- oder der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette, wie in Anspruch 1 dargelegt, kodiert.
- 4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His oderSer] Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly] Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschliche Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten. Sequenz sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus

Phe<sub>302</sub> $\rightarrow$ Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub> $\rightarrow$ Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub> $\rightarrow$ Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub> $\rightarrow$ Trp oder Thr; His<sub>318</sub> $\rightarrow$ Lys; Ala<sub>319</sub> $\rightarrow$ Ser; Asn<sub>320</sub> $\rightarrow$ Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub> $\rightarrow$ Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (ein  $\beta_A/\beta_B$ -Hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu; Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu oder Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche  $\beta_B$ -Kette kodiert.

- 6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/ oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist und das den weiteren Schritt der Gewinnung von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
- 7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
- Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- Verfahren nach Anspruch 8, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für eine Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, 8 oder 9, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
  - 11. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.

5

10

15

- 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
- Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
- 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 10-12, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
  - 15. Verfahren nach Anspruch 10 oder 13, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
- 35 16. Zusammensetzung, umfassend menschliches oder Schweine-Inhibin, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Ketten aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt sind, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern sind; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.
- 45 17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt sind, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 18. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Varianten ausgewählt werden aus: den Schweine-Inhibinderiva-
- worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz, sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten,

die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

5

35

40

- 19. Zusammensetzung nach Anspruch 16, umfassend eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (a β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette.
- 20. Zusammensetzung, umfassend eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, ist, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
- 21. Zusammensetzung, umfassend ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - 22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, die ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder eine der Aminosäuresequenz-Varianten davon ist.
- 23. Zusammensetzung, umfassend ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub> mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - 24. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluss der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette mit der Sequenz

- und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 25. DNA nach Anspruch 24, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ket-

ten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.

5

10

20

35

40

45

- 26. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln] Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln] Inhβ<sub>B</sub>, worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inhβ<sub>B</sub> die für den entsprechenden Inhβ<sub>A</sub>-Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin-β<sub>A</sub>-Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher α-Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
- 27. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante einer menschlichen β-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→lle oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (ein β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> Hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oderLys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
  - 28. DNA nach einem der Ansprüche 24 bis 27, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
  - 29. DNA nach einem der Ansprüche 24 bis 28, die mit einer detektierbaren Gruppe markiert ist.
- 25 30. Replizierbarer Vektor, der eine DNA nach einem der Ansprüche 21 bis 27 umfaßt.
  - 31. Vektor nach Anspruch 30, der einen viralen Promotor aufweist, der mit der für die Inhibin-α- und/oder -β-Ketten kodierenden DNA operal verbunden ist.
- 30 32. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 33. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die für eine Inhibin-β-Kette, nicht jedoch für die Inhibin-α-Kette kodiert
  - 34. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette und der partiellen Rinder-Inhibin-β-Kette mit der Sequenz

und wobei die Variante 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Anti-

körpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.

- 35. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäure-sequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 36. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten

 $\begin{array}{l} (\mathsf{Asn}_{266} \to \mathsf{Gln}] \ \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Cys}_{325} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{324} \to \Delta] \ \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Cys}_{361} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{363} \to \Delta] \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Lys}_{321} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Lys}_{322} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_A; \ [\mathsf{Lys}_{315} \to \mathsf{Arg}; \mathsf{Val}_{316} \to \mathsf{Thr}] \ \mathsf{Inh}\beta_A; \ [\mathsf{Cys}_{388} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{390} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_A, \ (\mathsf{Lys}_{411} \to \mathsf{Gln}] \ \mathsf{Inh}\beta_A; \ [\mathsf{Arg}_{315} \to \mathsf{Lys}; \ \mathsf{Val}_{316} \to \mathsf{Thr}] \mathsf{Inh}\beta_B; \ [\mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{320} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_B; \ [\mathsf{Pro}_{381} \ \mathsf{Gly}_{382} \to \mathsf{Pro} \ \mathsf{Phe} \ \mathsf{Gly}] \mathsf{Inh}\beta_B; \ [\mathsf{Arg}_{395} \to \mathsf{Gln}] \mathsf{Inh}\beta_B, \end{array}$ 

worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inh $\beta_B$  die für den entsprechenden Inh $\beta_A$ -Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung i eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 - 297, 364 - 376 und 387 - 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

37. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante einer menschlichen  $\beta_A$ -Inhibin-Kette, ausgewählt aus:

Phe $_{302}$   $\rightarrow$  Ile oder Leu; Gln $_{297}$   $\rightarrow$  Asp oder Lys; Trp $_{307}$   $\rightarrow$  Tyr oder Phe; Trp $_{310}$   $\rightarrow$  Tyr oder Phe; Ile $_{311}$   $\rightarrow$  Phe oder Val; Tyr $_{317}$   $\rightarrow$  Trp oder Thr; His $_{318}$   $\rightarrow$  Lys; Ala $_{319}$   $\rightarrow$  Ser; Asn $_{320}$   $\rightarrow$  Gln, Tyr oder His; Tyr $_{321}$   $\rightarrow$  Thr oder Asp, Phe $_{340}$   $\rightarrow$  Tyr; His $_{353}$   $\rightarrow$  Asp; His $_{353}$   $\rightarrow$  Lys (ein  $\beta_A/\beta_B$ -Hybrid); Phe $_{356}$   $\rightarrow$  Tyr; Val $_{364}$   $\rightarrow$  Phe; Val $_{364}$   $\rightarrow$  Leu; Tyr $_{375}$   $\rightarrow$  Thr; Tyr $_{376}$   $\rightarrow$  Trp; Asn $_{389}$   $\rightarrow$  Gln, His oder Lys; Ile $_{391}$   $\rightarrow$  Leu oder Thr; Met $_{390}$   $\rightarrow$  Leu oder Ser; Val $_{392}$   $\rightarrow$  Phe, Glu, Thr oder Ile; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen  $\beta_B$ -Kette kodiert.

- 38. Zelle nach irgendeinem der Ansprüche 34 37, die eine eukaryotische Zelle ist.
- 39. Zellfreie Zusammensetzung, die frei von reifem α-Ketten-Polypeptid ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
  - 40. Zellfreie Zusammensetzung, umfassend

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

(Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8) STWHVFPVSSSIQRLLD-

QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin-β<sub>B</sub>-Ketten-Prodomänensequenz

# CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV

(Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGADGQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS

(Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

5

20

25

30

35

40

45

50

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen α-Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die menschlichen Inhibin-α-Ketten-Prodomänensequenzen

#### KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA (Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

- 41. Zellfreie Zusammensetzung umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
- 42. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.
  - 43. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_B$ -Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer

β<sub>B</sub>-Ketten-Sequenz ist.

5

10

20

25

- 44. Zusammensetzung nach Anspruch 40, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
  - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die dargestellt wird durch die Aminosäuren: 28-58; 61-87; 90-108; 111-179; 182-213; 216-258; oder 28-87 aus Fig. 2B; oder b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die dargestellt werden durch die Aminosäuren: 20-54 oder 70-228 aus Fig. 1 B.
- 45. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 44, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.
- 46. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 45, die steril ist und worin das Polypeptid weiters ein immunogenes Polypeptid umfaßt.
  - 47. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
  - 48. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46, worin das Polypeptid an eine detektierbare Gruppe konjugiert ist.
  - 49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - 50. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 44, 48 oder 49, die durch nichtkovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
- 51. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46, 48 oder 49, weiters umfassend eine physiologisch annehmbare, implantierbare Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polpypeptids in die Gewebe eines Tieres.

# Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : LU

- Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 45 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine Inhibin-β-Kette oder eine Aminosäuresequenzvariante davon mit Ausnahme der nativen menschlichen oder Schweine-β<sub>A</sub> kodiert.
  - Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten

worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inh $\beta_B$  die für den entsprechenden Inh $\beta_A$ -Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 - 297, 364 - 376 und 387 - 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind, kodiert.

- 5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine Variante einer menschlichen  $\beta_A$ -Inhibin-Kette, ausgewählt aus
  - Phe<sub>302</sub> $\rightarrow$ Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub> $\rightarrow$ Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub> $\rightarrow$ Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub> $\rightarrow$ Trp oder Thr; His<sub>318</sub> $\rightarrow$ Lys; Ala<sub>319</sub> $\rightarrow$ Ser; Asn<sub>320</sub> $\rightarrow$ Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub> $\rightarrow$ Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (ein  $\beta_A/\beta_B$ -Hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu; Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu oder Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche  $\beta_B$ -Kette kodiert.
- 6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/ oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist und das den weiteren Schritt der Gewinnung von Inhibin oder eines β-Ketten-Dimers aus dem Kulturmedium umfaßt.
  - 7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
  - Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- Verfahren nach Anspruch 8, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für eine Präpro-Form einer
   Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 8 oder 9, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.

5

10

20

45

50

- 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
- 13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
  - 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 10 bis 12, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
- 40 15. Verfahren nach Anspruch 10 oder 13, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 16. Zusammensetzung, umfassend menschliches oder Schweine-Inhibin, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Ketten aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt sind, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-a-Kette, und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern sind; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.
  - 17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Sequenzen der α- und β-Ketten aus jenen ausgewählt sind, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
  - Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die Varianten ausgewählt werden aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→In] GInhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ] Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>;

 $\begin{array}{l} [\text{Lys}_{322} \rightarrow \text{His oder Ser}] \\ \text{Inh}_{\beta_{A}}; [\text{Lys}_{315} \rightarrow \text{Arg}; \text{Val}_{316} \rightarrow \text{Thr}] \\ \text{Inh}_{\beta_{A}}; [\text{Cys}_{388} \text{ oder Cys}_{390} \rightarrow \Delta] \\ \text{Inh}_{\beta_{B}}; [\text{Cys}_{319} \rightarrow \text{Cys}_{320} \rightarrow \Delta] \\ \text{Cys}_{\beta_{B}}; [\text{Cys}_{319} \rightarrow \text{Cys}_{320} \rightarrow \Delta] \\ \text{Cys}_{\beta_$ 

- worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inh $\beta_B$  die für den entsprechenden Inh $\beta_A$ -Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
- 19. Zusammensetzung nach Anspruch 16, umfassend eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus Phe<sub>302</sub>→Ille oder Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys ein β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub> Hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen β<sub>B</sub>-Kette.

5

20

25

35

40

- 20. Zusammensetzung, umfassend eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Kette), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
- 21. Zusammensetzung, umfassend ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
- 30 22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, die ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder einer der Aminosäuresequenz-Varianten davon ist.
  - 23. Zusammensetzung, umfassend ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub> mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei die Zusammensetzung frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - 24. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluss der Rinder-Inhibin-α-Kette, und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 25. DNA nach Anspruch 24, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
- 26. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten (Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> oder Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> oder Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> oder Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> oder Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> oder Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln] Inhβ<sub>B</sub>,

worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inh $\beta_B$  die für den entsprechenden Inh $\beta_A$ -Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 - 297, 364 - 376 und 387 - 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.

- 27. DNA nach Anspruch 24, die für eine Variante einer menschlichen β-Inhibin-Phe<sub>302</sub>→Ile oder Leu; Kette, ausgewählt aus Gln<sub>297</sub>→Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp oder Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr oder His; Tyr<sub>321</sub>→Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (ein β<sub>A</sub>/B<sub>B</sub> Hybrid); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His oder Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu oder Thr; Met<sub>390</sub> →Leu oder Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr oder Ile; oder einer vergleichbar modifizierten menschlichen β<sub>B</sub>-Kette kodiert.
- 28. DNA nach einem der Ansprüche 24 bis 27, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
- 29. DNA nach einem der Ansprüche 24 bis 28, die mit einer detektierbaren Gruppe markiert ist.
- 30. Replizierbarer Vektor, der eine DNA nach einem der Ansprüche 21 bis 27 umfaßt.

5

10

15

25

30

35

40

45

50

- 20 31. Vektor nach Anspruch 30, der einen viralen Promotor umfaßt, der mit der für die Inhibin-α- und/oder -β-Ketten kodierenden DNA operal verbunden ist.
  - 32. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 33. Vektor nach Anspruch 30 oder 31, der DNA enthält, die für eine Inhibin-β-Kette, nicht jedoch für die Inhibin-α-Kette kodiert.
  - 34. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist, jedoch unter Ausschluß der Rinder-Inhibin-α-Kette, und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
    - 35. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
    - 36. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante kodiert, ausgewählt aus: den Schweine-Inhibinderivaten
      - $(\mathsf{Asn}_{266} \to \mathsf{Gin}) \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Cys}_{325} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{324} \to \Delta] \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Cys}_{361} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{363} \to \Delta] \mathsf{Inh}\alpha; \ [\mathsf{Lys}_{321} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Lys}_{322} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{A}}; \ [\mathsf{Lys}_{322} \to \mathsf{His} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Ser}] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{A}}; \ [\mathsf{Lys}_{315} \to \mathsf{Arg}; \ \mathsf{Val}_{316} \to \mathsf{Thr}] \ \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{A}}; \ [\mathsf{Cys}_{388} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{390} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{A}}, \ [\mathsf{Lys}_{411} \to \mathsf{Gin}] \ \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{A}}; \ [\mathsf{Arg}_{315} \to \mathsf{Lys}; \ \mathsf{Val}_{316} \to \mathsf{Thr}] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{B}}; \ [\mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{oder} \ \mathsf{Cys}_{320} \to \Delta] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{B}}; \ [\mathsf{Pro}_{381} \ \mathsf{Gly}_{382} \to \mathsf{Pro} \ \mathsf{Phe} \ \mathsf{Gly}] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{B}}; \ [\mathsf{Arg}_{395} \to \mathsf{Gin}] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{B}}, \ [\mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Oder} \ \mathsf{Cys}_{320} \to \mathsf{Oder}] \mathsf{Inh}\beta_{\mathsf{B}}; \ [\mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Cys}_{319} \to \mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Cys}_{319} \to \mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Cys}_{319} \to \mathsf{Cys}_{319} \ \mathsf{Cys}_{31$
      - worin Inh eine Abkürzung für Inhibin ist und die Nummern der Reste für Inh $\beta_B$  die für den entsprechenden Inh $\beta_A$ -Rest verwendeten sind (siehe Fig. 2B); den menschlichen Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Varianten, die Variationen aufweisen, die Substitution oder Löschung eines Restes oder Einfügung neben einem Rest, ausgewählt aus den Resten 293 297, 364 376 und 387 398, der in Fig. 8 dargestellten Sequenz sind; und den Varianten menschlicher  $\alpha$ -Ketten, die zu mehr als 90% homolog zu der in Fig. 6A dargestellten Sequenz sind.
  - 37. Wirtszelle nach Anspruch 34, worin die DNA für eine Variante einer menschlichen β<sub>A</sub>-Inhibin-Kette, ausgewählt aus:
    - Phe<sub>302</sub> $\rightarrow$ Ile oder Leu; Gln<sub>297</sub> $\rightarrow$ Asp oder Lys; Trp<sub>307</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Trp<sub>310</sub> $\rightarrow$ Tyr oder Phe; Ile<sub>311</sub> $\rightarrow$ Phe oder Val; Tyr<sub>317</sub> $\rightarrow$ Trp oder Thr; His<sub>318</sub> $\rightarrow$ Lys; Ala<sub>319</sub> $\rightarrow$ Ser; Asn<sub>320</sub> $\rightarrow$ Gln, Tyr oder His;
    - Tyr<sub>321</sub> $\rightarrow$ Thr oder Asp, Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (ein  $\beta_A/\beta_B$  Hybrid); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe;

 $Val_{364} \rightarrow Leu$ ;  $Tyr_{375} \rightarrow Thr$ ;  $Tyr_{376} \rightarrow Trp$ ;  $Asn_{389} \rightarrow Gln$ , His oder Lys;  $Ile_{391} \rightarrow Leu$  oder Thr;  $Met_{390} \rightarrow Leu$  oder Ser;  $Val_{392} \rightarrow Phe$ , Glu, Thr oder Ile; oder eine vergleichbar modifizierte menschliche  $\beta_B$ -Kette kodiert.

- 5 38. Zelle nach irgendeinem der Ansprüche 34 37, die eine eukaryotische Zelle ist.
  - 39. Zellfreie Zusammensetzung, die frei von reifem α-Ketten-Polypeptid ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-a-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen gebildeten Antikörpern ist.
  - 40. Zellfreie Zusammensetzung, umfassend

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

# HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-

RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA
(Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8)

STWHVFPVSSSIQRLLD-

QGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_B$ -Ketten-Prodomänensequenz

CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV (Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

HILSRLQMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYVLEKGS (Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

# LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

5

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänensequenzen

10

# KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

15

20

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERA

(Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

25

41. Zellfreie Zusammensetzung umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen ist und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.

30

42. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_A$ -Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta_A$ -Ketten-Sequenz ist.

35

43. Zusammensetzung nach Anspruch 41, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_B$ -Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta_B$ -Ketten-Sequenz ist.

40

**44.** Zusammensetzung nach Anspruch 40, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:

45

a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\Omega_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die beschrieben wird durch die Aminosäuren: 28-58; 61-87; 90-108; 111-179; 182-213; 216-258; oder 28-87 aus Fig. 2B; oder b) ein Polypeptid, das frei von reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die dargestellt werden durch die Aminosäuren: 20-54 oder 70-228 aus Fig. 1B.

**45.** Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 44, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.

50

46. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 45, die steril ist und worin das Polypeptid weiters ein immunogenes Polypeptid umfaßt.

- 47. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
- **48.** Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46, worin das Polypeptid an eine detektierbare Gruppe konjugiert ist.

- 49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
- 50. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 44, 48 oder 49, die durch nichtkovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger untöslich gemacht ist.
- 51. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 39 bis 46, 48 oder 49, weiters umfassend eine physiologisch annehmbare, implantierbare Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polpypeptids in die Gewebe eines Tieres.

#### 10 Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : GR

5

15

20

25

- 1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine allelische Variante von menschlicher oder Schweine-Inhibinα- und/oder -β-Kette kodiert.
- 4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/ oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung der Inhibin-α-Kette, Inhibin-β-Kette, von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
  - 5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
  - Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
- Verfahren nach Anspruch 6, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für eine Präpro-Form einer
   Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, 6 oder 7, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
- 9. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.
  - 10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
- 11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
  - 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8 bis 10, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
- 13. Verfahren nach Anspruch 8 oder 11, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 14. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer

β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Kette aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt sind, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz sind und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern sind; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Sequenzen der α-und β-Ketten aus jenen ausgewählt sind, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.

5

- 16. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Kette), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, ist, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin ein Homodimer von reifen menschlichen Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder einer der Aminosäuresequenz-Varianten davon gewonnen wird.
- 19. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub> mit reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Heterodimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
- 20. Nicht-chromosomale DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
  - 21. DNA nach Anspruch 20, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
  - 22. DNA nach Anspruch 20 oder 21, die frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
  - 23. DNA nach einem der Ansprüche 20 bis 22, die mit einer detektierbaren Gruppe markiert ist.
- 55 24. Replizierbarer Vektor, der eine DNA nach Anspruch 20 oder 21 umfaßt.
  - 25. Vektor nach Anspruch 24, der einen viralen Promotor aufweist, der mit der für die Inhibin-α- und/oder -β-Ketten kodierenden DNA operal verbunden ist.

- 26. Vektor nach Anspruch 24 oder 25, der DNA umfaßt, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert.
- 27. Vektor nach Anspruch 24 oder 25, der DNA umfaßt, die für eine Inhibin-β-Kette, nicht jedoch für die Inhibin-α-Kette kodiert.
- 28. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- 29. Wirtszelle nach Anspruch 28, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- 30. Zelle nach Anspruch 28 oder 29, die eine eukaryotische Zelle ist.

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

- 31. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, die frei von reifer α-Ketten-Sequenz ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine Aminosäuresequenz-Variante einer dieser Prodomänen-Sequenzen enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen ist und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
- 32. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend
  - a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

**HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL** 

(Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)

PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8)

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_B$ -Ketten-Prodomänensequenz

# CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV

(Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)

5

HILSRLOMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-LEKGS (Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)

15

10

VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)

20

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)

25

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänensequenzen

# **KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV**

30

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

35

HALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFR-PSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGH-APPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA (Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

40

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

45

33. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen ist und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpem ist.

- 34. Verfahren nach Anspruch 33, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer β<sub>A</sub>-Ketten-Sequenz ist.
- 35. Verfahren nach Anspruch 33, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_B$ -Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta_B$ -KettenSequenz ist.
  - 36. Verfahren nach Anspruch 32, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:

a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die dargestellt wird durch die Aminosäuren: 28-58; 61-87; 90-108; 111-179; 182-213; 216-258; oder 28-87 aus Fig. 2B; oder b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die dargestellt werden durch die Aminosäuren: 20-54 oder 70-228 aus Fig. 1B.

- Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird.
- 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 37, worin die Zusammensetzung steril ist, und weiters umfassend das Verbinden des Polypeptids mit einem immunogenen Polypeptid.
  - 39. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 38 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
  - **40.** Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, welters umfassend das Konjugieren des Polypeptids an eine detektierbare Gruppe.
  - 41. Verfahren nach Anspruch 40, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - **42.** Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, 40 oder 41, worin die Zusammensetzung durch nichtkovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
  - 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, 40 oder 41, weiters umfassend das Mischen der Zusammensetzung mit einer physiologisch annehmbaren, implantierbaren Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polpypeptids in die Gewebe eines Tieres.

### Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, AT

5

15

20

25

30

35

- 1. Verfahren, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert wurde, der Nukleinsäure enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin die Nukleinsäure für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine menschliche oder Schweine-inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, worin der Vektor für eine allelische Variante von menschlicher oder Schweine-Inhibinα- und/oder -β-Kette kodiert.
  - 4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Nukleinsäure, die für die Inhibin-α-Kette und/ oder -β-Kette kodiert, mit einem von der Wirtszelle erkannten Promotor operabel verbunden ist, und das den weiteren Schritt der Gewinnung der Inhibin-α-Kette, Inhibin-β-Kette, von Inhibin oder einem β-Ketten-Dimer aus dem Kulturmedium umfaßt.
    - 5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zelle ein Prokaryot ist.
- Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-α-Kette oder einer Inhibin-β-Kette kodiert.
  - 7. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Vektor eine Nukleinsäure umfaßt, die sowohl für eine Präpro-Form einer

Inhibin-α-Kette als auch einer Inhibin-β-Kette kodiert.

5

15

20

25

35

40

- 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, 6 oder 7, worin die Zelle eine Zelle aus einem vielzelligen Organismus ist und hormonell aktives Inhibin produziert wird.
- 9. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Promotor ein viraler Promotor ist.
- 10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Promotor ein SV40-Promotor ist.
- 10 11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin reifes Schweine- oder menschliches Inhibin gewonnen wird.
  - 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8 bis 10, worin der Vektor Nukleinsäure umfaßt, die für die Präpro-Form einer Inhibin-β-Kette kodiert, und ein reifes β-Ketten-Dimer frei von der α-Kette gewonnen wird.
  - 13. Verfahren nach Anspruch 8 oder 11, worin die β-Kette die β<sub>A</sub>-Kette ist und das Inhibin in einer Konzentration von über etwa 20 ng/ml im Kulturmedium vorliegt.
  - 14. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Aminosäuresequenzen der α- und β-Kette aus jenen in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellten ausgewählt sind, und durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Varianten, wobei die Varianten im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern sind; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzen; wobei die Zusammensetzung vollständig frei von nicht identifizierten menschlichen oder Schweine-Proteinen ist.
- 15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Inhibin menschliches oder Schweine-Inhibin ist, das aus einer α- und einer β-Kette besteht, wobei die Sequenzen der α-und β-Ketten aus jenen ausgewählt sind, die in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
  - 16. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine Prodomäne von menschlichem oder Schweine-α- oder -β<sub>B</sub>-Inhibin, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β<sub>B</sub>-Kette), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 9 (menschliche β<sub>B</sub>-Kette) dargestellt, ist, die nicht mit nativer Glykosylierung assoziiert ist.
    - 17. Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Homodimer von reifen menschlichen oder Schweine-Inhibin-β<sub>A</sub>- oder -β<sub>B</sub>-Ketten, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Dimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
    - 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin ein Homodimer von reifen menschlichen Schweine-β<sub>B</sub>-Ketten oder einer der Aminosäuresequenz-Varianten davon gewonnen wird.
- Verfahren nach Anspruch 4, worin ein β-Ketten-Dimer gewonnen wird, das ein Heterodimer von reifem menschlichem oder Schweine-Inhibin-β<sub>B</sub>, wobei die Ketten wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder einer durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Heterodimer frei von der Inhibin-α-Kette ist.
  - $\textbf{20.} \ \ \text{Verfahren zur Herstellung von nicht-chromosomaler DNA, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-} \boldsymbol{\alpha}\text{-} \ \text{oder } \boldsymbol{\alpha}$

eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt; wobei das Verfahren chemische Synthese, Screenen von mRNA aus dem Eierstock oder Screenen der genomischen Sammlungen jeder Zelle umfaßt.

- 21. Verfahren nach Anspruch 20, worin DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α- oder eine menschliche oder Schweine-Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenz wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt ist.
  - Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, worin die nicht-chromosomale DNA frei von intervenierenden untranslatierten Sequenzen ist.
    - 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, weiters umfassend den Schritt des Markierens der nicht-chromosomalen DNA mit einer detektierbaren Gruppe.
- 20 24. Verfahren zur Herstellung eines replizierbaren Vektors, wobei das Verfahren das Einfügen einer DNA nach Anspruch 20 oder 21 in einen Klonungsvektor umfaßt.
  - 25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die DNA in einen Vektor eingefügt wird, der einen viralen Promotor aufweist, der mit der für die Inhibin-α- und/oder -β-Ketten kodierenden DNA operal verbunden ist, um dadurch einen Expressionsvektor zu produzieren.
  - 26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin DNA, die sowohl für eine Inhibin-α- als auch eine Inhibin-β-Kette kodiert, in den Vektor eingefügt wird.
- 30 27. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, worin DNA, die für eine Inhibin-β-Kette, nicht jedoch für die Inhibin-α-Kette kodiert, in den Vektor eingefügt wird.
  - 28. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Vektor transformiert wurde, der DNA enthält, die für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind, oder für eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution eines Polypeptids mit einer der dargestellten Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante kodiert, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz ist und 1) kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist; oder 2) ähnliche hormonelle Aktivität wie ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz besitzt.
    - 29. Wirtszelle nach Anspruch 28, worin die DNA für eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Kette und/oder eine -Inhibin-β-Kette kodiert, deren Aminosäuresequenzen wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette), Fig. 2B (Schweine-β-Ketten), Fig. 6A (menschliche α-Kette) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt sind.
    - 30. Zelle nach Anspruch 28 oder 29, die eine eukaryotische Zelle ist.

5

15

25

35

40

45

- 31. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, die frei von reifer α-Ketten-Sequenz ist, die eine menschliche oder Schweine-Inhibin-α-Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenz, wie in Fig. 1B (Schweine-α-Kette) oder Fig. 6A (menschliche α-Kette) dargestellt, oder eine Aminosäure-sequenz-Variante einer dieser Prodomänen-Sequenzen enthält, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenzen ist und kreuzreaktiv mit gegen ein Polypeptid mit einer dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpern ist.
- 55 32. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend
  - a) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz

|    | HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL  |
|----|---|
|    | (Aminosäuren 1 - 40 aus Fig. 8)   |
| 5  |   |
|    | PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG   |
|    | (Aminosäuren 44 - 80 aus Fig. 8)  |
| 10 | ) FIGURE MECHANIST THE ROOM SWEET HER CONTROL OF THE  |
|    | AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-  |
| 15 | RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA  |
|    | (Aminosäuren 83 - 185 aus Fig. 8)   |
| 20 | STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG   |
|    | (Aminosäuren 188 - 230 aus Fig. 8)  |
| 25 | oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; b) ein Polypeptid, umfassend die menschliche Inhibin- $\beta_B$ -Ketten-Prodomänensequenz   |
|    | CTSCGGFRRPEELGRVDGDFLEAV  |
|    | (Aminosäuren 7 - 30 aus Fig. 9)   |
| 30 | UTI CDI OVDODDVITTI I COMPANIA  |
|    | HILSRLOMRGRPNITHAVPKAAMVTALRKLHAGKVREDGRVEIPHLDGHASPGAD-  |
| 35 | GQERVSEIISFAETDGLASSRVRLYFFISNEGNQNLFVVQASLWLYLKLLPYV-  |
|    | LEKGS (Aminosäuren 33 - 145 aus Fig. 9)   |
| 40 | VRVKVYFQEQGHDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE  |
|    | (Aminosäuren 149 - 195 aus Fig. 9)  |
|    | LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI  |
| 45 | (Aminosäuren 198 - 241 aus Fig. 9)  |
| 50 | oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon; oder c) ein Polypeptid, das frei von der reifen $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend menschlichen Inhibin $\alpha$ -Ketten-Prodomänensequenzen |
|    | KVRALFLDALGPPAVTREGGPGV   |
|    |   |

(Aminosäuren 1 - 24 aus Fig. 6)

HALGGFTHRGSEPEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPLLGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSG-GERA
(Aminosäuren 32 - 199 aus Fig. 6)

oder natürlich vorkommende Säugetier-Aminosäuresequenz-Varianten davon.

- 33. Verfahren nach Anspruch 4, worin die gewonnene Inhibin-Kette eine zellfreie Zusammensetzung ist, umfassend ein menschliches oder Schweine-Inhibin-β-Ketten-Prodomänen-Polypeptid mit einer Sequenz, wie in Fig. 2B (Schweine-β-Ketten) und Fig. 8 und 9 (menschliche β-Ketten) dargestellt, oder eine durch Einfügung, Löschung oder Substitution einer dieser Prodomänen-Polypeptide mit einer dieser Sequenzen erhaltene Aminosäuresequenz-Variante ist, wobei die Variante im wesentlichen homolog zu einem Polypeptid mit einer der dargestellten Sequenz gebildeten Antikörpem ist
- 20 **34.** Verfahren nach Anspruch 33, worin die β-Kette die  $β_A$ -Kette ist und die Zusämmensetzung frei von reifer  $β_A$ -Ketten-Sequenz ist.
  - 35. Verfahren nach Anspruch 33, worin die  $\beta$ -Kette die  $\beta_B$ -Kette ist und die Zusammensetzung frei von reifer  $\beta_B$ -Ketten-Sequenz ist.
  - **36.** Verfahren nach Anspruch 32, worin die Variante die entsprechende Schweine-Aminosäuresequenz ist, wobei die Zusammensetzung enthält:
    - a) ein Polypeptid, umfassend die Schweine-Inhibin- $\beta_A$ -Ketten-Prodomänensequenz, die beschrieben wird durch die Aminosäuren: 28-58; 61-87; 90-108; 111-179; 182-213; 216-258; oder 28-87 aus Fig. 2B; oder b) ein Polypeptid, das frei von der reifen  $\alpha$ -Ketten-Aminosäuresequenz ist, umfassend die Schweine-Inhibin- $\alpha$ -Ketten-Prodomänen-Polypeptidsequenzen, die dargestellt werden durch die Aminosäuren: 20-54 oder 70-228 aus Fig. 1B.
- 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36, worin das Polypeptid nicht von nativer Glykosylierung begleitet wird
  - 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bsi 37, worin die Zusammensetzung steril ist, und weiters umfassend das Verbinden des Polypeptids mit einem immunogenen Polypeptid.
  - 39. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 38 zur Herstellung eines Antikörpers, der in der Lage ist, das Polypeptid zu binden.
- **40.** Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, weiters umfassend das Konjugieren des Polypeptids an eine detektierbare Gruppe.
  - 41. Verfahren nach Anspruch 40, worin die Gruppe ein Enzym, Fluorophor oder Radioisotop ist.
  - **42.** Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, 40 oder 41, worin die Zusammensetzung durch nichtkovalente Absorption oder kovalente Vernetzung an einen wasserunlöslichen Träger unlöslich gemacht ist.
    - 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38, 40 oder 41, weiters umfassend das Mischen der Zusammensetzung mit einer physiologisch annehmbaren, implantierbaren Matrix zur gesteuerten Freisetzung des Polpypeptids in die Gewebe eines Tieres.

55

50

5

10

15

25

30

#### Revendications

5

10

15

50

55

#### Revendications pour les Etats contractants suivants : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL, SE

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'aminoacides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'aminoacides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée mais excluant la chaîne α d'inhibine bovine et la chaîne β partielle d'inhibine bovine de séquence Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser-, et
  - 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 25 3. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour une chaîne β d'inhibine, ou un de ses variants de séquence d'amino-acides, autre que la chaîne β<sub>A</sub> humaine ou porcine naturelle ou la chaîne β d'inhibine bovine partielle spécifiée dans la revendication 1.
- 4. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly] Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 5. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; Ile<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
  - 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et contenant l'étape supplémentaire de séparation de l'inhibine ou d'un dimère de chaîne β du milieu de culture.
  - 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
  - 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.
  - Procédé suivant la revendication 8, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme prépro de la chaîne α d'inhibine et de la chaîne β d'inhibine.

- 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, 8 et 9, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
- 11. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.

5

10

20

25

30

35

40

- 12. Procédé suivant la revendicatioon 11, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
- 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
- 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 10 à 12, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
- 15. Procédé suivant la revendication 10 ou 13, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et l'inhibine présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml de milieu de culture.
  - 16. Composition contenant de l'inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, mais à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.
  - 17. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les séquences des chaînes α et β sont choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 18. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les variants sont choisis entre : des dérivés d'inhibine porcine (Asn<sub>266</sub>→In)]GInhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα ; [Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα ; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ] Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub> ; Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ] Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→GIn]Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ] Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→GIn] Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquels Inh représente une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine β<sub>A</sub> possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence réprésentée sur la figure 8; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
  - 19. Composition suivant la revendication 16, comprenant un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys; (un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; Ile<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 20. Composition comprenant un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé à une glycosylation naturelle.
- 21. Composition comprenant un homodimère de chaînes β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une des séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une

séquence représentée ; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.

22. Composition suivant la revendication 21, qui est un homodimère!de chaînes β humaine ou porcine mature ou d'un de ses variants de séquence d'amino-acides.

5

10

25

30

35

40

45

- 23. Composition comprenant un hétérodimère d'inhibine β<sub>A</sub> humaine ou porcine mature avec l'inhibine β<sub>B</sub> humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'aminoacides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
- 24. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont décrites sur les figures 1B (chaîne α porcine), 2B (chaînes β porcines), 6A (chaîne α humaine) et 8 et 9 (chaînes β humaines) ou pour un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, le variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine et de la chaîne β d'inhibine bovine partielle de séquence Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Asp-Trp-Ile-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His-Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-HisSer, et
  - 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
  - **25.** ADN suivant la revendication 24, codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 26. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln] Inhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα ; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα ; [Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser] Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inh<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> ; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondants (voir figure 2B) ; les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8 ; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
  - 27. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant d'une chaîne β d'inhibine humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
- 28. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 27, qui est dépourvu de séquences non traduites intermédiaires.
  - 29. ADN suivant l'une quelconque des revendication 24 à 28, qui est marqué avec un groupement détectable.
  - 30. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant l'une quelconque des revendications 21 à 27.
  - 31. Vecteur suivant la revendication 30, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes α et/ou β d'inhibine.

- 32. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne α d'inhibine et une chaîne β d'inhibine.
- 33. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant pour une chaîne β d'inhibine, mais pour la chaîne α d'inhibine.
- 34. Cellule hôte transformation avec un vecteur réplicable comprenant l'ADN codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une telle séquence représentée, le variant étant pratiquement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine et de la chaîne β d'inhibine bovine partielle de séquence Gly-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Lys-Val-Asn-Ile-Cys-Cys-Lys-Gln-Phe-Phe-Val-Ser-Phe-Lys-Asp-Ile-Gly-Trp-Asn-Trp-Ile-Ala-Pro-Ser-Gly-Tyr-His-Ala-Asn-Tyr-Cys-Glu-Gly-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Gly-Thr-Ser-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Phe-His- Ser-Thr-Val-Ile-Asn-His-Tyr-Arg-Met-Arg-Gly-His-Ser, et
  - 1) présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) présentant une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 20 35. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'inhibine humaine porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 36. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant choisi entre : des dérivés d'ihibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ] Inhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ] Inhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ) Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser] Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ] Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln] Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ)Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293-297, 364-376 et 387-398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 37. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant d'une chaîne  $\beta_A$  d'inhibine humaine choisie entre Phe<sub>302</sub> $\rightarrow$ Ille ou Leu; Gln<sub>297</sub> $\rightarrow$ Asplou Lys; Trp<sub>307</sub> $\rightarrow$ Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub> $\rightarrow$ Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub> $\rightarrow$ Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub> $\rightarrow$ Trp ou Thr; His<sub>318</sub> $\rightarrow$ Lys; Ala<sub>319</sub> $\rightarrow$ Ser; Asn<sub>320</sub> $\rightarrow$ Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub> $\rightarrow$ Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub> $\rightarrow$ Tyr; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Asp; His<sub>353</sub> $\rightarrow$ Lys (à un hybride  $\beta_A/\beta_B$ ); Phe<sub>356</sub> $\rightarrow$ Tyr; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Phe; Val<sub>364</sub> $\rightarrow$ Leu; Tyr<sub>375</sub> $\rightarrow$ Thr; Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His ou Lys; Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu ou Thr; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu ou Ser; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne  $\beta_B$  humaine modifiée de manière comparable.
  - 38. Cellule suivant l'une quelconque des revendications 34 à 37, qui est une cellule eucaryotique.
  - 39. Composition acellulaire qui est dépourvue d'un polypeptide de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par une insertion, délétion ou substitution d'une telle séquence de prodomaine, le variant présentant une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences présentant une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
  - 40. Composition acellulaire contenant

5

10

15

25

30

50

55

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (aminoacides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

5

10

15

20

25

30

35

40

50

55

(aminoacides 83 à 185 de la figure 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine CTSCGGFRR-PEELGRVDGDFLEAV (amino-acides) 7-30 de la figure 9, (amino-acides 33 à 5 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-acides 149 à 195 de la figure 9),

# LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI

(amino-acides 149 à 195 de la figure 9), LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9), ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère : ou

c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (aminoacides 1 à 24 de la figure 6).

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6), ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère.

- 41. Composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 42. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne β et la chaîne β<sub>A</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>A</sub> mature.
  - 43. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_B$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\beta_B$  mature.
  - **44.** Composition suivant la revendication 40, dans laquelle le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, composition contenant :

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les aminoacides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les aminoacides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ; ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature comprenant les séquences de polypeptides de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ;

ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.

5

25

30

35

40

45

50

- 45. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, dans laquelle le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
- 46. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 45, qui est stérile et dans laquelle le polypeptide comprend en outre un polypeptide immunogène.
- 47. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier audit polypeptide.
  - 48. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, dans laquelle le polypeptide est conjugué à un groupe détectable.
- 49. Composition suivant la revendication 48, dans laquelle le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
  - 50. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, 48 et 49, qui est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
- 51. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, 48 et 49, comprenant en outre une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

# Revendications pour l'Etat contractant suivant : LU

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'aminoacides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée mais excluant la chaîne α d'inhibine bovine et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 3. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour une chaîne β d'inhibine, ou un de ses variants de séquence d'amino-acides, autre que la β<sub>Δ</sub> humaine ou porcine naturelle.
- 4. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly] Inhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquel Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); les variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de la chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 55 5. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu;

 $Tyr_{375} \rightarrow Thr$ ;  $Tyr_{377} \rightarrow Trp$ ;  $Asn_{389} \rightarrow Gln$ , His ou Lys;  $Ile_{391} \rightarrow Leu$  ou Thr;  $Met_{390} \rightarrow Leu$  ou Ser;  $Val_{392} \rightarrow Phe$ , Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne  $\beta_B$  humaine modifiée de manière comparable.

- 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et contenant l'étape supplémentaire de séparation de l'inhibine ou d'un dimère de chaîne β du milieu de culture.
  - 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
- 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine d'une chaîne β d'inhibine.
  - Procédé suivant la revendication 8, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme de pré-pro de la chaîne α d'inhibine et de la chaîne β d'inhibine.
  - 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, 8 et 9, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
  - 11. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.

5

15

20

25

35

40

45

50

- 12. Procédé suivant la revendicatioon 11, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
- 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
- 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 10 à 12, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
- 30 15. Procédé suivant la revendication 10 ou 13, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et l'inhibine présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml de milieu de culture.
  - 16. Composition contenant de l'inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, mais à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.
  - 17. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les séquences des chaînes α et β sont choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 18. Composition suivant la revendication 16, dans laquelle les variants sont choisis entre : des dérivés d'inhibine porcine (Asn<sub>266</sub>→In]Glnhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ] Inhα ; [Cys<sub>363</sub> →Δ] Inhα ; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser]Inhβ<sub>A</sub> ; Lys<sub>315</sub>→Arg ; Val<sub>316</sub>→Thr] Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln]Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→ Pro Phe Gly] Inhβ<sub>B</sub> ; [Arg<sub>395</sub>→Gln] Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquels Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence réprésentée sur la figure 8 ; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
  - 19. Composition suivant la revendication 16, comprenant un variant d'une chaîne d'inhibine  $\beta_A$  humaine choisi entre

Phe $_{302}$ —Ille ou Leu; Gln $_{297}$ —Asp ou Lys; Trp $_{307}$ —Tyr ou Phe; Trp $_{310}$ —Tyr ou Phe; Ile $_{311}$ —Phe ou Val; Tyr $_{317}$ —Trp ou Thr; His $_{318}$ —Lys; Ala $_{319}$ —Ser; Asn $_{320}$ —Gln, Tyr ou His; Tyr $_{321}$ —Thr ou Asp, Phe $_{340}$ —Tyr; His $_{353}$ —Asp; His $_{353}$ —Lys; (un hybride  $\beta_A/\beta_B$ ); Phe $_{356}$ —Tyr; Val $_{364}$ —Phe; Val $_{364}$ —Leu; Tyr $_{375}$ —Thr; Tyr $_{376}$ —Trp; Asn $_{389}$ —Gln, His ou Lys; Ile $_{391}$ —Leu ou Thr; Met $_{391}$ —Leu ou Ser; Val $_{392}$ —Phe, Glu, Thr ou Ile; ou une chaîne  $\beta_B$  humaine modifiée de manière comparable.

20. Composition comprenant un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représenté sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé à une glycosylation naturelle.

5

10

15

25

45

- 21. Composition comprenant un homodimère de chaînes β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une des séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
- 22. Composition suivant la revendication 21, qui est un homodimère de chaînes  $\beta_B$  humaine ou porcine mature ou d'un de ses variants de séquence d'amino-acides.
  - 23. Composition comprenant un hétérodimère de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec une chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou d'un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est dépourvue de la chaîne α d'inhibine.
- 24. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps!engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 40 25. ADN suivant la revendication 24 codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'aminoacides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 26. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln] lnhα; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ] lnhα; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ] lnhα; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ] lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>322</sub>→His ou Ser] lnhβ<sub>A</sub>; [Lys<sub>315</sub>→Arg; val<sub>316</sub>→Thr] lnhβ<sub>A</sub>; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ] lnhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln] lnhβ<sub>A</sub>; [Arg<sub>315</sub>→Lys; Val<sub>316</sub>→Thr]lnhβ<sub>B</sub>; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]lnhβ<sub>B</sub>; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]lnhβ<sub>B</sub>; [Arg<sub>395</sub>→Gln]lnhβ<sub>B</sub>, dans lesquels lnh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour la lnhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de lnhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B); des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 27. ADN suivant la revendication 24, qui code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β humaine choisi entre : Phe<sub>302</sub>—lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>—Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>—Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>—Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>—Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>—Trp ou Thr; His<sub>318</sub>—Lys; Ala<sub>319</sub>—Ser; Asn<sub>320</sub>—Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>—Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>—Tyr; His<sub>353</sub>—Asp; His<sub>353</sub>—Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>—Tyr; Val<sub>364</sub>—Phe; Val<sub>364</sub>—Leu; Tyr<sub>375</sub>—Thr;

Tyr<sub>376</sub> $\rightarrow$ Trp ; Asn<sub>389</sub> $\rightarrow$ Gln, His ou Lys Ile<sub>391</sub> $\rightarrow$ Leu ou Thr ; Met<sub>390</sub> $\rightarrow$ Leu ou Ser ; Val<sub>392</sub> $\rightarrow$ Phe, Glu, Thr ou lle ; ou une chaîne  $\beta_R$  humaine modifiée de manière comparable.

- 28. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 27, qui est dépourvue de séquences non traduites intermédiaires.
  - 29. ADN suivant l'une quelconque des revendications 24 à 28, qui est marquée avec un groupement détectable.
- 30. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant l'une quelconque des revendications 21 à 27.

5

- 31. Vecteur suivant la revendication 30, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes α et/ou β d'inhibine.
- 32. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine.
  - 33. Vecteur suivant la revendication 30 ou 31, qui contient un ADN codant pour une chaîne  $\beta$  d'inhibine mais non pour la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.
- 34. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine et/ou la chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 18 (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée, à l'exclusion de la chaîne α d'inhibine bovine, et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 35. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α d'inhibine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines) la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 36. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant choisi entre : des dérivés d'inhibine porcine [Asn<sub>266</sub>→Gln]Inhα ; [Cys<sub>325</sub> ou Cys<sub>324</sub>→Δ]Inhα ; [Cys<sub>361</sub> ou Cys<sub>363</sub>→Δ]Inhα ; [Lys<sub>321</sub> ou Lys<sub>322</sub>→Δ] Inhβ<sub>A</sub> ; [Lys<sub>315</sub>→Arg; Val<sub>316</sub>→Thr) Inhβ<sub>A</sub> ; [Cys<sub>388</sub> ou Cys<sub>390</sub>→Δ]Inhβ<sub>A</sub>, [Lys<sub>411</sub>→Gln] Inhβ<sub>A</sub> ; [Arg<sub>315</sub>→Lys ; Val<sub>316</sub>→Thr]Inhβ<sub>B</sub> ; [Cys<sub>319</sub> ou Cys<sub>320</sub>→Δ]Inhβ<sub>B</sub> ; [Pro<sub>381</sub> Gly<sub>382</sub>→Pro Phe Gly]InhβB ; [Arg<sub>395</sub>→Gln]Inhβ<sub>B</sub>, dans lesquels Inh est une abréviation d'inhibine et les numéros des résidus pour Inhβ<sub>B</sub> sont ceux utilisés pour le résidu de Inhβ<sub>A</sub> correspondant (voir figure 2B) ; des variants de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine possédant des variations qui consistent en une substitution ou une délétion au niveau d'un, ou une insertion après un, résidu choisi entre les résidus 293 à 297, 364 à 376 et 387 à 398 de la séquence représentée sur la figure 8; et des variants de chaîne α humaine qui présentent une homologie de plus de 90 % avec la séquence représentée sur la figure 6A.
- 37. Cellule hôte suivant la revendication 34, dans laquelle l'ADN code pour un variant d'une chaîne d'inhibine β<sub>A</sub> humaine choisi entre Phe<sub>302</sub>→lle ou Leu; Gln<sub>297</sub>→Asp ou Lys; Trp<sub>307</sub>→Tyr ou Phe; Trp<sub>310</sub>→Tyr ou Phe; lle<sub>311</sub>→Phe ou Val; Tyr<sub>317</sub>→Trp ou Thr; His<sub>318</sub>→Lys; Ala<sub>319</sub>→Ser; Asn<sub>320</sub>→Gln, Tyr ou His; Tyr<sub>321</sub>→Thr ou Asp, Phe<sub>340</sub>→Tyr; His<sub>353</sub>→Asp; His<sub>353</sub>→Lys (à un hybride β<sub>A</sub>/β<sub>B</sub>); Phe<sub>356</sub>→Tyr; Val<sub>364</sub>→Phe; Val<sub>364</sub>→Leu; Tyr<sub>375</sub>→Thr; Tyr<sub>376</sub>→Trp; Asn<sub>389</sub>→Gln, His ou Lys; lle<sub>391</sub>→Leu ou Thr; Met<sub>390</sub>→Leu ou Ser; Val<sub>392</sub>→Phe, Glu, Thr ou lle; ou une chaîne β<sub>B</sub> humaine modifiée de manière comparable.
  - 38. Cellule suivant l'une que!conque des revendications 34 à 37, qui est une cellule eucaryotique.
- 39. Composition acellulaire qui est dépourvue de polypeptide de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par une insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un

polypeptide d'une séquence représentée.

40. Composition acellulaire contenant

5

10

15

20

25

30

35

40

55

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino-acides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKANRTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (aminoacides 83 à 185 de la figure 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8), ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $_{\rm B}\beta$  d'inhibine humaine CTSCGGFRR-PEELGRVDGDFLEAV (amino-acides) 7 à 30 de la figure 9, (amino-acides 33 à 145 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (aminoacides 149 à 195 de la figure 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine

KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure 6),

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6), ou un de leurs variants de séquence d'aminoacides naturels de mam-

- 41. Composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 42. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>A</sub> mature.
  - 43. Composition suivant la revendication 41, dans laquelle la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_B$  et la composition est dépourvue de séquence de chaîne  $\beta_B$  mature.
  - 44. Composition suivant la revendication 40, dans laquelle le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, composition contenant :

a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les amino-acides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les aminoacides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ; ou les amino-acides 28 à 87 de la figure 2B ; ou b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.

- **45.** Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, dans laquelle le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
- **46.** Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 45, qui est stérile et dans laquelle le polypeptide comprend en outre un polypeptide immunogène.
- 47. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier audit polypeptide.
  - **48.** Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, dans laquelle le polypeptide est conjugué à un groupe détectable.
- 49. Composition suivant la revendication 48, dans laquelle le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
  - 50. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 44, 48 et 49, qui est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
- 51. Composition suivant l'une quelconque des revendications 39 à 46, 48 et 49, comprenant en outre une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

### Revendications pour l'Etat contractant suivant : GR

5

10

30

35

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui comprend un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B ((chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'aminoacides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour un variant allélique d'une chaîne α et/ou d'une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine.
  - 4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est liée de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte et comprenant l'étape supplémentaire consistant à séparer la chaîne α d'inhibine, la chaîne β d'inhibine, l'inhibine ou un dimère de chaîne β du milieu de culture.
    - 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
- 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.
  - 7. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour les formes

pré-pro de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine et d'une chaîne  $\beta$  d'inhibine.

5

15

50

- 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6 et 7, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et de l'inhibine douée d'activité hormonale est produite.
- 9. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.
- 10. Procédé suivant la revendication 9, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
- 10 11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel de l'inhibine porcine ou humaine mature est recueillie.
  - 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 8 à 10, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
  - 13. Procédé suivant la revendication 8 ou 11, dans lequel la chaîne β et la chaîne β<sub>A</sub> et l'inhibine est présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml dans le milieu de culture.
- 14. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et des variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui sont fortement homologues avec un polypeptide d'une séquence représentée, et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui possèdent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines non identifiées.
- 30 15. Procédé suivant la revendication 14, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 35 16. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β<sub>B</sub> porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaînes β humaines), non associé à une glycosylation naturelle.
- 17. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne β qui est un homodimère de chaînes β ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée; dimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.
  - 18. Procédé suivant la revendication 17, dans lequel un homodimère de chaînes β<sub>B</sub> humaines ou porcines matures ou d'un d'un de leurs variants de séquence d'amino-acides est recueilli.
  - 19. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne β qui est un hétérodimère de chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec une chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou .2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; dimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.

- 20. ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 21. ADN suivant la revendication 20, codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 22. ADN suivant la revendication 20 ou 21, qui est dépourvue de séquences non traduites intermédiaires.
  - 23. ADN suivant l'une quelconque des revendications 20 à 22, qui est marqué avec un groupement détectable.
  - 24. Vecteur réplicable comprenant un ADN suivant la revendication 20 ou 21.

5

15

25

30

35

40

45

50

- 25. Vecteur suivant la revendication 24, comprenant un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour les chaînes α et/ou β d'inhibine.
  - 26. Vecteur suivant la revendication 24 ou 25, qui contient un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine.
  - 27. Vecteur suivant la revendication 24 ou 25, qui contient un ADN codant pour une chaîne  $\beta$  d'inhibine, mais non pour la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.
- 28. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'une séquence représentée.
  - 29. Cellule hôte suivant la revendication 28, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'aminoacides sont représentées sur la figure 1B (α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
  - 30. Cellule suivant la revendication 28 ou 29, qui est une cellule eucaryotique.
  - 31. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition cellulaire, dépourvue de séquence de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences représentées et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
  - Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant
    - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $eta_A$  d'inhibine humaine

HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (aminoacides 1 à 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),

AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

(aminoacides 83 à 185 de la figure 8),

STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino-acides 188 à 230 de la figure 8),

ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_B$  d'inhibine humaine CTSCGGFRR-PEELGRVDGDFLEAV (amino-acides) 7 à 30 de la figure 9, (amino-acides 33-145 de la figure 9),

VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-acides 149 à 195 de la figure 9),

LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides 198 à 241 de la figure 9),

ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes  $\alpha$  mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine humaine

KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure 6),

(amino-acides 32 à 199 de la figure 6), ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère.

- 33. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences polypeptidiques de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.
- 34. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>A</sub> mature.
  - 35. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>B</sub> et la composition est dépourvue de séquence de chaîne β<sub>B</sub> mature.
- 36. Procédé suivant la revendication 32, dans lequel le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, la composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par :

des amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les aminoacides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les aminoacides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ou les aminoacides 28 à 87 de la figure 2B ; ou b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature, comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.

- 37. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 36, dans lequel le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
- 38. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 37, dans lequel la composition est stérile, et comprend en outre le couplage du polypeptide à un polypeptide immunogène.
  - 39. Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier au polypeptide.
  - **40.** Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, comprenant en outre la conjugaison du polypeptide à un groupe détectable.
  - 41. Procédé suivant la revendication 40, dans lequel le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
  - 42. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, 40 et 41, dans lequel la composition est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
  - 43. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 ou 40 à 41, comprenant en outre le mélange de la composition à une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.

### Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, AT

5

15

20

25

30

35

- 1. Procédé comprenant la culture d'une cellule hôte transformée avec un vecteur qui renferme un acide nucléique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou pour une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'aminoacides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), ou un variant de séquence d'aminoacides formé par insertion, délétion ou substitution d'une des séquences représentées, le variant étant fortement homologue avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une activité croisée avec les anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée.
- 2. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel l'acide nucléique code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le vecteur code pour un variant allélique de chaîne α et/ou de chaîne β d'inhibine humaine ou porcine.
  - 4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'acide nucléique codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine est lié de manière fonctionnelle à un promoteur reconnu par la cellule hôte, et comprenant l'étape supplémentaire de séparation de la chaîne α d'inhibine, de la chaîne β d'inhibine, de l'inhibine ou d'un dimère de chaîna β du milieu de culture.
    - 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule est un procaryote.
- 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne α d'inhibine ou d'une chaîne β d'inhibine.
  - 7. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour les formes

pré-pro de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine et d'une chaîne  $\beta$  d'inhibine.

5

15

50

- 8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6 et 7, dans lequel la cellule est une cellule provenant d'un organisme pluricellulaire et une inhibine douée d'activité hormonale est produite.
- 9. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel le promoteur est un promoteur viral.
- 10. Procédé suivant la revendication 9, dans lequel le promoteur est un promoteur de SV40.
- 10 11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel une inhibine porcine humaine mature est recueillie.
  - 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 8 à 10, dans lequel le vecteur comprend un acide nucléique codant pour la forme pré-pro d'une chaîne β d'inhibine et un dimère de chaîne β mature est recueilli en l'absence de chaîne α.
  - 13. Procédé suivant la revendication 8 ou 11, dans lequel la chaîne β est la chaîne β<sub>A</sub> et l'inhibine est présente à une concentration supérieure à environ 20 ng/ml dans le milieu de culture.
- 14. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'amino-acides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine), et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines), et les variants de séquence d'amino-acides engendrés par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variants qui présentent une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présentent une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présentent une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; composition qui est totalement dépourvue de protéines humaines ou porcines identifiées.
- 30 15. Procédé suivant la revendication 14, dans lequel l'inhibine est une inhibine humaine ou porcine constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β, les séquences d'aminoacides desdites chaînes α et β étant choisies entre celles représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines).
- 35 16. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est un prodomaine d'inhibine α ou β<sub>B</sub> humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaîne β<sub>B</sub> porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) et la figure 9 (chaîne β<sub>B</sub> humaine) non associé et à une glycosylation naturelle.
- 17. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recuelli un dimère de chaîne β qui est un homodimère de chaîne β<sub>A</sub> ou β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant représentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée ; dimère qui est dépourvu de la chaîne α d'inhibine.
  - 18. Procédé suivant la revendication 17, dans lequel un homodimère de chaînes β<sub>B</sub> humaines ou porcines matures ou un de ses variants de séquence d'amino-acides est recueilli.
  - 19. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel est recueilli un dimère de chaîne β qui est un hétérodimère de chaîne β<sub>A</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature avec la chaîne β<sub>B</sub> d'inhibine humaine ou porcine mature, lesdites chaînes étant présentées sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'aminoacides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée ; 2) qui présente une réactivité croisée avec des récepteurs de surface cellulaire pour un polypeptide de séquence représenté ; ou 3) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide

d'une séquence représentée ; homodimère qui est dépourvu de la chaîne  $\alpha$  d'inhibine.

5

10

15

20

30

40

45

50

- 20. Procédé de production d'un ADN non chromosomique codant pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide d'une séquence représentée, procédé comprenant une synthèse chimique, une sélection d'ARNm d'ovaires ou une sélection de banques génomiques de n'importe quelle cellule.
- 21. Procédé suivant la revendication 20, dans lequel l'ADN code pour une chaîne α d'inhibine humaine ou porcine ou une chaîne β d'inhibine humaine ou porcine dont la séquence d'amino-acides est représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcine), la figure 6A (chaîne α humaine) ou la figure 8 ou 9 (chaînes β humaines).
- 22. Procédé suivant la revendication 20 ou 21, dans lequel l'ADN non chromosomique est dépourvu de séquences non traduites intermédiaires.
- 23. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 22, comprenant en outre l'étape de marquage de l'ADN non chromosomique avec un groupement détectable.
- 24. Procédé de production d'un vecteur réplicable, procédé comprenant l'insertion d'un ADN suivant la revendication
   20 ou 21 dans un vecteur de clonage.
  - 25. Procédé suivant la revendication 24, dans lequel l'ADN est inséré dans un vecteur qui possède un promoteur viral lié de manière fonctionnelle à l'ADN codant pour la chaîne α et/ou la chaîne β d'inhibine afin de produire ainsi un vecteur d'expression.
  - 26. Procédé suivant la revendication 24 ou 25, dans lequel un ADN codant à la fois pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et une chaîne  $\beta$  d'inhibine est insérée dans le vecteur.
- 27. Procédé suivant la revendication 24 ou 25, dans lequel un ADN codant pour une chaîne β d'inhibine mais non pour la chaîne α d'inhibine est inséré dans le vecteur.
  - 28. Cellule hôte transformée avec un vecteur réplicable comprenant un ADN codant pour la chaîne α d'inhibine humaine ou porcine et/ou une chaîne β d'inhibine dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne α porcine), la figure 2B (chaînes β porcines), la figure 6A (chaîne α humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'un polypeptide d'une desdites séquences représentées, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une séquence représentée et 1) qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée; ou 2) qui présente une activité hormonale similaire à celle d'un polypeptide dune séquence représentée.
  - 29. Cellule hôte suivant la revendication 28, dans laquelle l'ADN code pour une chaîne  $\alpha$  d'inhibine et/ou une chaîne  $\beta$  d'inhibine humaine ou porcine, dont les séquences d'amino-acides sont représentées sur la figure 1B (chaîne  $\alpha$  porcine), la figure 2B (chaînes  $\beta$  porcines), la figure 6A (chaîne  $\alpha$  humaine) et les figures 8 et 9 (chaînes  $\beta$  humaines).
  - 30. Cellule suivant la revendication 28 ou 29, qui est une cellule eucaryotique.
  - 31. Procédé suivant la revendicatioin 4, dans lequel la chaîne inhibine recueillie est une composition acellulaire dépourvue de séquences de chaîne α mature, contenant une séquence polypeptidique de prodomaine de chaîne α d'inhine humaine ou porcine représentée sur la figure 1B (chaîne α porcine) ou la figure 6A (chaîne α humaine) ou un variant de séquence d'amino-acides d'une desdites séquences de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée.

|    | 32. Procédé suivant la revendicatioin 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant  |
|----|---|
| 5  | a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne $\beta_{\text{A}}$ d'inhibine humaine  |
|    | HSAAPDCPSCALAALPKDVPNSQPEMVEAVKKHILNMLHL (amino-acides 1 à  |
| 10 | 40 de la figure 8), PDVTQPVPKAALLNAIRKLHVGKVGENGYVEIEDDIG (aminoacides 44 à 80 de la figure 8),   |
|    | AEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEVWLFLKVPKAN-  |
|    | RTRTKVTIRLFQQQKHPQGSLDTGEEAEEVGLKGERSELLLSEKVVDA (amino-  |
| 15 | acides 83 à 185 de la figure 8),  |
|    | STWHVFPVSSSIQRLLDQGKSSLDVRIACEQCQESGASLVLLG (amino-acides   |
| 20 | 188 à 230 de la figure 8),  |
| 25 | ou un de ses variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; b) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne β <sub>B</sub> d'inhibine humaine CTSCGGFRR-PEELGRVDGDFLEAV (aminoacides) 7 à 30 de la figure 9, (amino-acides 33 à 145 de la figure 9),  |
|    | VRVKVYFQEQGHGDRWNMVEKRVDLKRSGWHTFPLTEAIQALFERGE (amino-   |
| 30 | acides 149 à 195 de la figure 9),   |
|    | LNLDVQCDSCQELAVVPVFVDPGEESHRPFVVVQARLGDSRHRI (amino-acides  |
|    | 198 à 241 de la figure 9),  |
| 35 | ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mammifère ; ou c) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaînes $\alpha$ mature comprenant les séquences de prodomaine de chaîne $\alpha$ d'inhibine humaine  |
| 40 | KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure  |
|    | <pre>KVRALFLDALGPPAVTREGGDPGV (amino-acides 1 à 24 de la figure<br/>6),</pre>   |
| 45 | (amino-acides 32 à 199 de la figure 6), ou un de leurs variants de séquence d'amino-acides naturels de mam-<br>mifère.  |
| 50 | 33. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la chaîne d'inhibine recueillie est une composition acellulaire contenant un polypeptide de prodomaine de chaîne β d'inhibine humaine porcine d'une séquence représentée sur la figure 2B (chaînes β porcines) et les figures 8 et 9 (chaînes β humaines) ou un variant de séquence d'amino-acides engendré par insertion, délétion ou substitution d'une desdites séquences polypeptidiques de prodomaine, variant qui présente une forte homologie avec un polypeptide d'une desdites séquences et qui présente une réactivité croisée avec des anticorps engendrés contre un polypeptide d'une séquence représentée. |

34. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne  $\beta$  est la chaîne  $\beta_A$  et la composition est dépourvue de

 $\textbf{35.} \ \ \text{Proc\'ed\'e suivant la revendication 33, dans lequel la chaîne } \beta \text{ est la chaîne } \beta_B \text{ et la composition est d\'epourvue de}$ 

séquence de chaîne  $\alpha_{\text{A}}$  mature.

séquence de chaîne  $\beta_B$  mature.

5

10

15

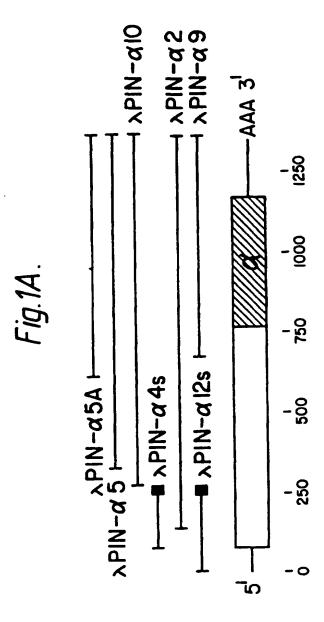
35

40

45

50

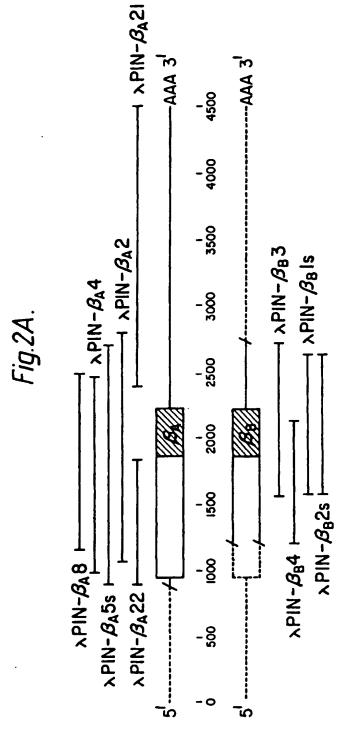
- 36. Procédé suivant la revendication 32, dans lequel le variant est la séquence d'amino-acides porcine correspondante, la composition contenant :
  - a) un polypeptide comprenant la séquence de prodomaine de chaîne  $\beta_A$  d'inhibine porcine représentée par : les amino-acides 28 à 58 ; les amino-acides 61 à 87 ; les aminoacides 90 à 108 ; les amino-acides 111 à 179 ; les aminoacides 182 à 213 ; les amino-acides 216 à 258 ou les aminoacides 28 à 87 de la figure 2B ; ou b) un polypeptide dépourvu de la séquence d'amino-acides de chaîne  $\alpha$  mature, comprenant les séquences polypeptidiques de prodomaine de chaîne  $\alpha$  d'inhibine porcine représentées par : les amino-acides 20 à 54 ; ou les amino-acides 70 à 228 de la figure 1B.
- 37. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 36, dans lequel le polypeptide est non accompagné par une glycosylation naturelle.
- 38. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 37, dans lequel la composition est stérile, et comprenant en outre le couplage du polypeptide à un polypeptide immunogène.
- **39.** Utilisation d'une composition suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 dans la préparation d'un anticorps capable de se lier au polypeptide.
  - **40.** Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, comprenant en outre la conjugaison du polypeptide à un groupe détectable.
- 25 41. Procédé suivant la revendication 40, dans lequel le groupe est un enzyme, un fluorophore ou un radioisotope.
  - **42.** Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38, 40 et 41, dans lequel la composition est insolubilisée par une absorption non covalente ou une réticulation covalente à un support insoluble dans l'eau.
- 43. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 31 à 38 ou 40 à 41, comprenant en outre le mélange de la composition à une matrice implantable physiologiquement acceptable pour la libération contrôlée du polypeptide dans les tissus d'un animal.



|     | . es  | 9<br>0<br>0<br>0                 | g lu<br>GAG             | arg<br>CGG   | P.T.S                                    | ala<br>GCT              | leu<br>CTG        |  |
|-----|---|----------------------------------|-------------------------|--|--|-------------------------|-------------------|--|
|     | a1a<br>6CC  | 91 <i>y</i><br>66A               | ser<br>TCT              | a]a<br>600   | phe<br>TTC                               | val<br>GTG              | val<br>GTC        |  |
|     | 16 Je 5   | 40<br>176                        | 20<br>913<br>660        | 100<br>1eu<br>CTG  | 130<br>trp<br>166                        | 160<br>Pro<br>CCT       | 190<br>CA 57      |  |
|     | leu<br>CTG  | ala<br>600                       | arg arg                 | alu<br>GAG   | leu<br>CTG                               | 91y<br>667              | Ais<br>CAC        |  |
|     | leu<br>TTG  | asp<br>GAT                       | arg<br>CGC              | 91y<br>66A   | gln leu<br>CAG CTG                       | arg                     | thr               |  |
| • • | Jeu<br>CTC  | leu<br>CTG                       | met ATG                 | ala gly glu<br>GCT GGA GAG   | ala<br>GCT                               | ser<br>TCC              | leu<br>776        |  |
|     | Jeu<br>CTC  | phe<br>TTC                       | Phe<br>TC               | ala<br>GCT   | Ser                                      | ser<br>TCA              | leu<br>TTG        |  |
|     | leu<br>CTG  | leu<br>CTG                       | 91y<br>660              | S S  | thr                                      |                         | pro<br>CCT        |  |
|     | 2<br>583  | ala<br>GCT                       | 91y<br>666              | g Ju<br>GAG  | val<br>GTG                               | ala<br>6CA              | leu<br>CTC        |  |
|     | SCT S   | arg<br>AGG                       | val<br>GTG              | asp<br>GAC   | £ 95                                     |                         | عاء<br>ودد        |  |
|     | tr<br>166   | val<br>GTG                       | ala<br>GCT              | 9 Jy<br>666  | arg<br>(60                               | leu<br>CTG              | ser<br>TCT        |  |
|     | net<br>ATG  | 1ys<br>AAG                       | his                     | Sign   | ser<br>AGC                               | asp<br>GAC              | عاء<br>ودد        |  |
|     |   | 30<br>ala<br>GCC                 | A6A                     | 90 <b>cys</b> 91y<br>arg <b>cys</b> 91y<br>ccc <b>(6)</b> 666                                    | 120<br>his<br>CAC                        | 150<br>1eu<br>CTG       | 180<br>ala<br>600 |  |
|     | TGTGGGGCAGACCCTGACAGAAGGGGCACAGGGCTGGGTGTGGGTTCACCGTTGGCAGGGCCAGGTGAGCT | leu<br>CTG                       | arg arg<br>CGA AGA      | ala<br>GCC   | AÇ F                                     | leu<br>CTG              | leu<br>CTG        |  |
| `   | CCAG  | val<br>GTC                       | _<br>200                | gly<br>GGT   | his<br>CAC                               | 0<br>2<br>2<br>3<br>3   | his               |  |
| •   | AGGG  | leu                              | Jeu<br>CTG              | th<br>ACA  | g<br>CAG                                 | 91y<br>666              | Jeu<br>CTG        |  |
|     | 766C  | g]u<br>GAG                       | erg<br>CGT              | ala<br>GCT   | ser<br>TCC                               | Z Š D                   | va)<br>6TG        |  |
|     | 1933  | arg<br>CGG                       | A66 a                   | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>7<br>5<br>7<br>5<br>7 | <u> </u>                                 | ser ser<br>AGC TCT      | ala<br>GCT        |  |
|     | TTCA  | as p<br>GAC                      | val<br>GTC              | phe<br>TTC   | arg<br>666                               | 1 2 3                   | trp<br>766        |  |
|     | .TGGG   | leu<br>CTG                       | 91y<br>66A              | leu<br>CTT   | phe<br>TTC                               | ala 6                   | arg<br>CGC        |  |
|     | 6676  | g lu<br>GAG                      | Pro<br>CCT              | í le<br>ATC  | val<br>GTA                               | ala<br>600              | Pro<br>CCT        |  |
|     | GCTG  | 5<br>5<br>5<br>5                 | asp<br>GAT              | ala<br>GCC   | ty<br>IAT                                | ala<br>6CA              | 500               |  |
|     | CAGG  | 2<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5  | 50<br>913<br>666        | 8 දි දි  | Ac A | 140<br>met<br>ATG       | 170<br>ala<br>GCG |  |
|     | 4299t   | 68<br>78<br>89                   | 91 <i>y</i><br>661      | ser<br>TCC   | phe<br>TTC                               | 9 <sup>3</sup> y<br>666 | gln<br>CAG        |  |
|     | AAGG  | 91y <b>2ys</b><br>660 <b>160</b> | 9<br>68                 | val<br>GTC   | leu<br>CTC                               | CAG<br>CAG              | 91y<br>66C        |  |
|     | ACAG  | ور<br>وور                        | 9 <sup>1</sup> y<br>666 | asp<br>GAT   | 91y<br>66C                               | arg<br>AGA              | Jeu<br>CTG        |  |
|     | )<br>)<br>(CT   | his<br>CAT                       | thr                     | 9]u<br>GAG   | glu<br>GAG                               | asp                     | ser<br>TCA        |  |
|     | AGAC  | 9] y<br>666                      | val<br>GTG              | g Ju<br>GAG  | g Ju<br>GAG                              | leu<br>CTG              | met<br>ATG        |  |
|     | )999  | ser<br>AGT                       | ala<br>GCA              | g)u<br>GAG   | ala<br>GCT                               | 91 <i>y</i><br>664      | 50                |  |
|     | TGTE  | arg<br>CGG                       | 500<br>500              | org<br>CCC   | g]u<br>GAG                               | thr                     | va)<br>GTG        |  |
|     | -   | 108                              | 198                     | 88<br>78   | 378                                      | 468                     | 558               |  |
|     |   | ••                               | •                       | ••   | •-•                                      | •                       | ٠,                |  |

# Fig. 18(II)

| Subunit  Subunit  CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC C  | 310 ala pro pro thr                                   | 340<br>met arg ser leu arg val arg thr thr ser<br>ATG AGG TCC CTA CGC GTT CGC ACC ACC TCG | A GGTGTCCCGCTGGTGGCCGAGCTCCC  | SAGGAAGGCAGAGTTCCCACCTCCCCTTTCCTTCCGCCTCTCCGCCTGGAGGCTCCCCTGTCCGCCCCTGTCCCATGGGTAATGTGACAATAAACAGCAT |                                |
|--|---|---|---|--|--------------------------------|
| 220<br>Agg Agg Agg Agg Agg Agg Agg Agg Agg Agg   | 310 ral pro gly ala pro pro                           | 340<br>ACC<br>ACC   | A GGTGTCCCGCTGGTGGCCGAG   | CATGGGTAATGTGACAATAAAC   |                                |
| 22<br>- arg ala ar<br>cos ccc As<br>25<br>- gln arg pr<br>cAs Ass cc<br>28<br>- 11e val hi   | ral pro 91y ala pro                                   | 34 ser leu arg val arg th<br>TCC CTA CGC GTT CGC AC                                       | IA GGGTGTCCCGCTGGTGGC   | CATGGGTAATGTGACAAT   |                                |
| - arg al<br>CGG GC<br>CGG GC<br>GG AG<br>CAG AG  | er val pro gly ala pr<br>CT GTC CCT GGG GCC CC        | ser leu arg val ar<br>TCC CTA CGC GTT CG  | :<br>A GGGTGTCCCGCTGG   | CATGGGTAATGTGA   |                                |
| # 1 P 1 E 1 E 1 E 1 E 1 E 1 E 1 E 1 E 1 E  | er val pro 91y al.                                    | ser leu arg va<br>TCC CTA CGC GT  | IA GGGTGTCCCG   | CATGGGTAAT   |                                |
| 1319 1240  | er val pro gl   | ser leu an<br>TCC CTA CG  | A 666TGT(   | CATGGG   |                                |
| ala his thr a GCC CAC ACT C arg leu leu c CGC CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG  | er val pro  | ser le  | ¥   | 3  |                                |
| E C C E  | er val  | Ser   |   | ည  |                                |
| ala<br>GCC<br>arg  | 5 5   |   | 18<br>18  | 7670   |                                |
| leu val 2<br>CTG GTG G<br>ala leu a<br>GCG CTG C<br>GGC TGG GGC TGG GGC TGG GGC TGG GGG GG | . VI F  | arg<br>AGG  | 364<br>ile  | ည္သ  |                                |
| 16u ala ala 600 600 600 600 600 600 600 600 600 60   | leu<br>CTG  | met<br>ATG  | 25  | TCCG   |                                |
| ala<br>SCC<br>SCC  | 50  | thr   | 339<br>339  | 500  |                                |
| thr pro phe 1 ACC CCC TTC C 240 Ser pro ala a 1 CC CCC GCC GCC 270 gln glu leu g   | leu pro<br>CTG CCC (                                  | gly thr g   | 360 555 ala 595 lle 0<br>5 CAC 361 GCC 160 ATC T                                | CTC  |                                |
| 210<br>thr<br>240<br>240<br>270<br>270<br>270<br>270<br>270  | 300<br>asn<br>AAC                                     | 330<br>GG GCT CAG CCC TGC GCT GCT GCT CCC CCG   | 360<br>545<br>545   | :100   |                                |
| ala<br>600<br>1100<br>1100<br>1100   | leu pro   | ]<br>CEC  | £8  | 3466(  |                                |
| Sed CCT Ser  | Jeu<br>CTG  | ala<br>GCT  | ACC thr   | )CTG(  |                                |
| trip 166   | thr   | ala<br>GCT  | leu<br>CTC  | 933  |                                |
| erg<br>CGG<br>CGC<br>CGG<br>Sasa   | 500   | 52  | leu<br>CTT  | CTC  |                                |
| ala<br>GCC<br>CTG<br>CTG   | gly gly cys gly leu pro thr                           | కిణ   | val pro asn leu leu thr gln<br>GTG CCC AAC CTT CTC ACC CAG                      | 993  |                                |
| ise CC1 Signature  | 91 y 666  | E 23  | £23   | CC11   |                                |
| Sela ala   | 25  | g<br>CAG  | va)<br>GTG  | CTTT   |                                |
| Act Act  | 91y<br>560  | ala<br>GCT  | thr<br>Acc  | 7007   |                                |
| # 150 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1  | 9 <del>7</del> 69 69 69 69 69 69 69 69 69 69 69 69 69 | 91y<br>666  | glu thr v<br>GAG ACG 0  | CACC   |                                |
| 200<br>16u<br>17c<br>16c<br>16c<br>16c<br>16c<br>16c   | 290<br>his  | 320<br>pro<br>CCA   | 350<br>Tyr  | 1100   | ₩.                             |
| pro leu cys ser cys ser ala arg pro glu ala cor crc figr rcc figr rc f             | \$ <b>5 5</b>   | va)<br>GTG  | 350<br>Tys tyr<br>AAG TAC   | AGAG   | AAA                            |
| arg cos  | tyr cys   | leu val<br>TTG GTG  | phe<br>TTC  | AGGC   | Ş.                             |
| arg<br>Age<br>Age  |   | leu<br>TTG  | zer<br>T  | AGGA   | <b>1</b> 6C6                   |
| CTG<br>CTG<br>SAG<br>CAG   | The C   | leu<br>CTG  | 15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>15<br>1 | CTGG   | 706                            |
| leu<br>CTG<br>gly<br>666   | 1)e<br>ATC  | org<br>CCC  | 9) y<br>66T   | CAGC   | TGAC                           |
| leu<br>CTG<br>GGA<br>Pro   | # # E   | g)n<br>CAG  | gly gly tyr<br>GGA GGT TAC  | GCAC   | CAGA                           |
| oglu B   |   | val<br>GTC  | asp<br>GAT  | ACAGGCACCAGCCTG(   | AGTGCAGATGACTCGGTGCGCAAAAAAAAA |
| 648<br>738   | 918   | 1008  | 1098  | 1194   | 1312                           |



## Fig. 2B(I)

| ser<br>TCC       | gln<br>CAG<br>GAC<br>asp  | 8000<br>8000<br>818                     | ala<br>GCG<br>AGC<br>Ser  | at 1 ag                                |
|------------------|---|---|---|--|
| 20<br>ser<br>AGT | ser<br>TCT<br>CTG   | 8 A A A S X                             | ala   | arg<br>CGC<br>TAC<br>tyr               |
| arg<br>AGG       | asn<br>AAC<br>CGG<br>arg  | <b>8888</b>                             | Age arg   | Teu<br>CTG<br>CTG                      |
| va)<br>GTG       | 9<br>5<br>5<br>5<br>5<br>7  | val<br>GTA<br>val                       | 91y<br>666<br>666<br>91y  | thr<br>Acc<br>Ccc<br>arg               |
| 1 Je<br>ATA      | val<br>GTA<br>CTG   | Pro<br>CCG<br>CCG<br>Bla                | ile<br>ATC<br>GAC<br>asp  | lys<br>AAG<br>GTC<br>val               |
| ile<br>ATT       | asp<br>GAG<br>glu   | gln<br>CAT<br>his                       | asp<br>GAC<br>CTG   | AGG<br>CGG<br>arg                      |
| trp<br>166       | lys<br>AAG<br>GAG<br>91u  | thr<br>Acc<br>thr                       | asp<br>GAC<br>CAC<br>His  | 25 zez                                 |
| 399              | pro<br>GAG<br>glu   | val<br>GTC<br>ATC<br>ile                | g Ju<br>GAG<br>CCG<br>pro   | TCC<br>Ser                             |
| ser 3            | leu<br>CTC<br>6C6<br>ala  | asp<br>GAT<br>AAC<br>asn                | 7(5() ()  | ala<br>600<br>ala                      |
| a]a<br>606       | thr<br>ACC<br>GGG<br>91y  | 200 g                                   | glu<br>GAG<br>GAG<br>91u  | Acc                                    |
| leu<br>TTG       | ala<br>600<br>19  | 2 8 8 E                                 | val<br>GTG<br>GTG<br>val  | 5555                                   |
| 10<br>1eu<br>176 | 40<br>Teu<br>CTG<br>GCG<br>ala  | Pys<br>GGC<br>9 Jy                      | # 6 4 4 5 6 4 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6   | 130<br>667<br>667<br>687<br>660<br>889 |
| phe<br>TTT       | ala<br>606<br>066<br>066<br>arg   | 7.7 AAG 27.8 arg                        | 919<br>666<br>667<br>919  | ala<br>GCA<br>ACA<br>thr               |
| 9 1 y<br>66 A    | ×5  | leu<br>TTG<br>ATG<br>met                | asn<br>AAC<br>GAC<br>asp  | glo<br>GAS<br>GAS<br>glu               |
| arg<br>AGA       | Ter<br>TCC  | hts<br>CAC<br>CAG<br>gln                | gle<br>GAG<br>glu   | ala<br>606<br>60A<br>ala               |
| leu<br>CTG       | oro<br>SSS  | Tec<br>CTG<br>Tec                       | 91y<br>666<br>660<br>arg  | ahe Tic                                |
| trp<br>766       | 89  | met<br>ATG<br>CGC<br>arg                | val<br>676<br>676<br>val  | Acc                                    |
| leu<br>CTT       | asp<br>GAC<br>GAC   | AAC<br>AAC<br>asn                       | 1ys<br>AAA<br>AAG<br>1ys  | 11e<br>ATC<br>11e                      |
| Jeu<br>TTG       | 5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5<br>5 | TTA<br>TTG<br>Jeu                       | 919<br>966<br>919   | 11e<br>ATC<br>11e                      |
| 53               | ala<br>GCC  | ile<br>ATC<br>ile                       | val<br>GT6<br>GC6<br>ala  | glu<br>6A6<br>6A6<br>9lu               |
| amet<br>ATG      | ala<br>GCA  | CAC<br>CAC<br>bis                       | his<br>CAT<br>his   | ser<br>Ser                             |
| ပ္ပ              | 30<br>Ser<br>AGC  | 2 & S & E                               | S S S S S S S S S S S S S S S S S S S   | 120<br>ACC<br>GTC<br>val               |
| SCCAGG           | his   | NA A & V                                | Z & & Z   | gln<br>CAG<br>CGG<br>arg               |
| 36CT(            | 9 J y<br>666  | val<br>GTC<br>cTG                       | a CSA a grage a region of the | 916<br>686<br>686<br>910               |
| )11:             | 9) y<br>666   | 8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | ile<br>ATC<br>CTG<br>Jeu  | met<br>ATG<br>CAA<br>91n               |
| ICAA(            | ser<br>TCC  | 9 lv<br>6A6<br>9 lv                     | ala<br>606<br>800<br>ala  | leu<br>CTC<br>GGC<br>GGC               |
| ACC/             | 91y<br>66A  | val<br>GTG<br>CTG<br>Jeu                | AAC<br>ACG<br>thr   | glu<br>GAA<br>GAC<br>asp               |
| AAAGGGCCGTCACCA  | 55  | met<br>ATG<br>TTC<br>phe                |   | asn<br>AAT<br>GCC<br>ala               |
| )999\            | thr<br>Acc  | glu<br>GAG<br>GAC<br>asp                |   | met<br>ATG<br>GGC<br>gly               |
| <b>A</b>         | 55<br>55<br>55<br>55<br>55<br>55<br>55  | مح<br>555<br>667<br>9اع                 | ala<br>600<br>81a   | gar<br>cct<br>pro                      |
| -                | 97  | 187                                     | 773   | 367                                    |

## Fig. 28(II)

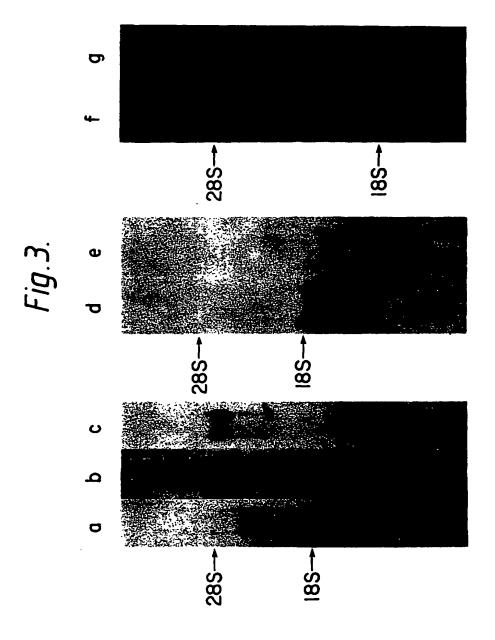
|     | arg<br>AGG                              | 0000                             | gln<br>CAG<br>91n                        | 91y<br>660<br>   | arg<br>CGG<br>arg                       |
|-----|---|----------------------------------|--|--|---|
| П   | ACC AC                                  | gle GAG                          | ATC CATC CATC CATC CATC CATC CATC CATC   | 1eu 9]<br>CT6 66   | CAC AC                                  |
|     | arg tl                                  | 91y<br>66c<br>7<br>91n<br>91n    | Ser 6<br>6<br>6<br>6<br>1<br>1           | CTG CT   | ser h<br>TCA C                          |
|     | AAC C                                   | valg<br>GTG G<br>TTC C<br>phe g  | ser s<br>AGC A<br>GAG G<br>glu a         | 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0  | gln S<br>CAG<br>GAG<br>T<br>glu S       |
| U   | ala a<br>GCC A                          | asp v<br>GAC G<br>TAC T<br>tyr p | ser s<br>TCC A<br>ACC G<br>thr g         | ) S S S S S S S S S S S S S S S S S S S  | 91u<br>6A6<br>91u<br>9 g                |
|     | lys a<br>AAG G                          | glu a<br>GAG G<br>GTG T<br>val t | val s<br>GTC T<br>CTC A<br>1eu t         | ser l<br>AGC C<br>GTG C<br>val p   | AAG BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB |
|     | Pro l                                   | ala g<br>GCG G<br>AAG G<br>Iys v | 500 E                                    | ala s<br>GCC A<br>GTG G<br>val v   | glu l<br>GAG A<br>GGC -                 |
|     | val<br>6TC<br>CTG<br>1eu l              | glu a<br>GAG G<br>GTC A<br>val 1 | Phe CTC CP                               | 9 7 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8  | 91u<br>6A6<br>6C6<br>9ro                |
| 09  | AAA AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG | 190<br>91u 9<br>6A6 6<br>666 6   | 220<br>11e<br>ATC 1<br>ACC C             |  | SAC GOS                                 |
|     | Teu / CTG / CTG / Teu /                 | 91y 666 666 661 (611 (72)        | his CAC                                  | glu g  | s s s s s s s s s s s s s s s s s s s   |
|     | TAC<br>tyr                              | ala<br>GCA<br>GCA<br>AAG (       | 156<br>166<br>170                        | 2 5 5 5 6 6 9 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6  | 588  <br>                               |
|     | le CC le                                | asp<br>GAC                       | 9) y 15                                  | 25,50  | ala<br>606                              |
| į   | t 58 5 4                                | a la<br>606                      | Ser<br>AGC<br>Ser                        | gln<br>CAG<br>GGC<br>91y   | 917                                     |
| •   | ile<br>ATC<br>CTG<br>Teu                | Ser                              | A A S S E                                | glu<br>GAG<br>GAC<br>asp   | g lu<br>GAG                             |
|     | glu<br>GAA<br>AGT<br>Ser                | 9 y 660<br>660                   | 1 8 8 8 8 V                              | <u>१ इहर</u>   | 91y<br>66A                              |
|     | ala<br>600<br>81a                       | CAA                              | ala<br>600<br>016<br>100                 | ala<br>600<br>CAG<br>gla   | GAC                                     |
|     | arg<br>CGC<br>CAG<br>91n                | 28                               | asp<br>GAC<br>asp                        | thr<br>ACT<br>GTG<br>val   | \$8ª                                    |
|     | glu<br>GAG<br>GTA<br>val                | 2500 gra                         | val<br>GTG<br>Val                        | arg<br>CGG<br>GAC<br>asp   | Age 1                                   |
| 150 | val<br>GTG<br>GTG<br>val                |                                  | 210<br>val<br>616<br>616<br>arg          | 240<br>ile<br>ATC<br>CTG   | Age 4                                   |
|     | val<br>GTG<br>TTC                       | gln<br>CAG<br>AGC                | 1ys<br>AAG<br>1ys                        | asp<br>GAC<br>AAC  | 919                                     |
|     | ser<br>TCC<br>CTG                       | 9 1 6 6 6 6 6 9 Jy               | glu<br>glu                               | 100 m  | . 93u                                   |
|     | ieu<br>CTG<br>S AAC                     | e gln<br>r cAA<br>s AAG          | s ser<br>7 TCG<br>5 GTG<br>1 val         | ala<br>600<br>600<br>9 arg   | ala<br>606                              |
|     | r asp<br>c CAG<br>n gln                 | o GAG                            | u ile<br>G ATT<br>C GTG<br>P val         | 2 Ser 1 2 Ser 2 Ser 3 Se | 6 646                                   |
|     | y Agr                                   | 1 CTC                            | l leu<br>G CTG<br>G GAC<br>P asp         | CC Age<br>9 Ju   | 6 686                                   |
|     | u 91y<br>6 660<br>6 66T<br>u 91y        | e arg<br>C CGT<br>C GTT<br>r val | u val<br>A 6T6<br>C T66<br>9 trp         | 769 8<br>566 8<br>769 9  | 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0   |
|     | s glu<br>c gae<br>n glu                 | r ile<br>C ATC<br>T TAC          | r glu<br>GAA<br>CGC<br>arg               | 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9  | S 1 Jys                                 |
| 1   | ser lys                                 | val ser<br>GTC TCC<br>CCT<br>pro | lys ser<br>AAG AGC<br>GGC GAC<br>gly asp | su asp<br>16 GAC<br>17 GAG<br>1e glu   | 1 8 1                                   |
| 9   | l b                                     | 170<br>A&A 61                    | 200<br>glu l)<br>GAG AA<br>CAC GC        | 1eu leu<br>TG CTG<br>CTG TTT   | 1 5 5 1 5 5 1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 |
| Ä   | She start                               | ACC AV                           | 914 P                                    | 2 CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC C  | AS I                                    |
|     | 9448<br>P T G                           | 538 Au                           | 628                                      | 718<br>66<br>8   | 88<br>∏≒.≰ ≀                            |
|     | 4                                       | 70                               | 9  | 7  | ∞                                       |

## Fig. 2B(III)

|   | ile<br>ATC<br>CTC<br>Peu   | tyr cys<br>TAC TGC<br>TAC TGT<br>tyr Sys       | 91y<br>66C<br>66C<br>91y                 | fle<br>ATC<br>11e                               | AGCGCCGGGGCCCGGGGCCCGGGGACGACGGCGGCACGCACGCAAGGCAAAGCAAAAGCAAAAAA  |
|---|--|--|--|---|--|
|   | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn   | tyr<br>tyr<br>tyr                              | 200<br>000<br>000<br>000<br>000          | AAC<br>AAC<br>asn                               | 0000   |
|   | val<br>GTC<br>ACC<br>thr   | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn                       | Met<br>ATG<br>Met                        | gln<br>CAG<br>TAC<br>tyr                        | 7. ATG6  |
|   | 19 1ys<br>660 AAG<br>660 CG6<br>91y arg  | ala<br>600<br>666<br>91y                       | 200<br>000<br>000<br>000<br>000          | 91y<br>666<br>686<br>91u                        | ACGA<br>GCAC   |
|   | 2882   | his<br>CAC<br>TAT<br>tyr                       | tyr<br>tyr                               | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp                        | 9999   |
|   | asp asp  |  | his tyr<br>CAG TAC<br>91n tyr            | asp<br>GAC<br>GAT<br>asp                        | 0000<br>0000   |
|   | Second Se | <u> </u>                                       | 18888                                    | tyr<br>TAC<br>TTC<br>Phe                        | 266<br>266<br>266  |
|   | 8 88 9 Jule 9 9 | # # # # # # # # # # # # # # # # # # #          | ile<br>ATC<br>GTC<br>val                 | tyr<br>tyr                                      | 200  |
|   | Te CTS and   | Pro Ser CCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC AC | 370<br>val<br>cate<br>val                | 25 Je 1   | ACTG   |
|   | 5 8 8 9  | ala<br>600<br>ala                              | thr<br>ACG<br>GCC<br>ala                 | met<br>ATG<br>met                               | 9993   |
|   | arg 2000 arg arg arg   | ATC ATC  | ser<br>Acc<br>thr                        | 255 PS  | 9000<br>10000  |
|   | arg<br>CGG<br>AAG<br>1ys   | ATC<br>ATC<br>11e                              | his<br>CAC<br>CAC<br>his                 | met<br>ATG<br>ATG<br>met                        | CATE   |
|   | 250<br>000<br>000<br>200<br>200<br>200<br>200<br>200<br>200<br>200   | 138 tr   | phe 110                                  | t ACC T   | Ago  |
|   | arg<br>CGC<br>ATC<br>11e   | GAC<br>GAC<br>asp                              | ser<br>TCC<br>Ser                        | AGG<br>AGC<br>Ser                               | AM<br>TAG<br>OP  |
|   | 2500 pre   | AAC<br>AGT<br>Ser                              | leu<br>CTC<br>TCA<br>ser                 | Jeu<br>CTG<br>Teu                               | 424<br>ser<br>TCC<br>GCC   |
| 1 | A CAC his  | 176<br>166<br>170                              | ser<br>TCG<br>GCC                        | lys Age lys                                     | 6 16C 666 18C 1 CVS 1 CV |
|   | 231  | 9 660<br>9 9 9 9                               | ser<br>Ser                               | th Act  | 9<br>9<br>9<br>9<br>9<br>9<br>9  |
|   | his<br>CAC<br>AGG<br>arg   | ile<br>ATC<br>ile                              | 9<br>9<br>9<br>9<br>9<br>9               | <b>ESS E</b>                                    | 25 6 2   |
|   | 300<br>91u<br>GAG<br>AGC<br>ser  | 330<br>GAC<br>CTC                              | 360<br>ser<br>TCG<br>CCA<br>pro          | 390<br>val<br>GTC<br>ATC<br>ile                 | 9 689 6  |
|   | glu<br>GAA<br>GAC<br>asp   | Tys<br>AAG<br>CGC<br>arg                       | thr<br>ACG<br>GTG<br>val                 | <b>5</b> 225                                    | 9 to 686 by 1  |
|   | ser<br>TCC<br>66T<br>91y   | PTT9   | 919<br>986<br>919                        | 39 B 5  | val<br>6TG<br>GTG<br>val   |
|   | gla<br>CAG<br>CTG  | ser<br>AGT<br>GAC<br>asp                       | ile ala<br>ATA GCG<br>CTG GCA<br>leu ala | ser<br>Ser                                      | ile<br>ATC<br>11e  |
|   | arg 267  | val<br>GTC<br>ATC<br>ile                       |  | AAG<br>AAC<br>asn                               | met<br>ATG<br>met  |
|   | 8 000 ala  | phe TTC The                                    | ty<br>ty                                 | leu<br>CTC<br>GTG<br>val                        | asn<br>AAC<br>AAC<br>asn   |
|   | 91 CA6   | PF T T B                                       | Ser<br>GCC<br>ala                        | ASA<br>ACA<br>thr                               | ord<br>Pro   |
|   | leu<br>CTG<br>GTG<br>val   | 910<br>CA6<br>917                              | 500 g                                    | هاه<br>660<br>660<br>9ابر                       | ile<br>ATC<br>GTG<br>val   |
|   | met<br>ATG<br>GTG<br>val   | AAG<br>CAA<br>91n                              | 3225                                     | FE  | asp<br>GAC<br>GAC<br>asp   |
|   | CTC<br>CTC<br>GTG<br>Val   | lys<br>AGG<br>arg                              | 97u<br>GAG<br>AGC<br>ser                 | 380<br>Ser Pro<br>AGC CCC<br>AAC CCG<br>asn Pro | 410<br>1ys 1ys<br>AAG AAG<br>AAG CGG   |
|   | pro phe<br>CCC TTC<br>pro phe  | 825  | 350<br>919<br>660<br>919                 | 380<br>Ser<br>AGC<br>AAC                        | AAG<br>1ys<br>1ys  |
|   | <u>2</u>   | इन ह   | 91u<br>6A6<br>6A6<br>91u                 | his<br>CAC<br>CTG                               | ile<br>ATC<br>GTC<br>val   |
|   | 898  | 988  | 1078                                     | 1168  | 1258   |
|   |  |  | -  | -   | -  |

## Fig. 2B(I<u>V</u>.

- 8
- 2200 2200 2200 22440 2260 2800 2800 2800 33040 3160 33280

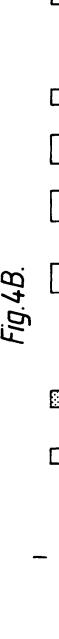


## Fig.4A

\$|L|E---|CDGRT|NL-|CGRQ|QFF|IDFR|L-IGW|SD|WI]IAPT|GY p.BA-Inh: h.B-TGF: p.BB-Inh:

HANY CEGECPSHIAGTSGSSLSFHSTYINHYRMRGHISPFA HANFCLGPCPYIWSLDT----QYSKVLAL-YNQ--HNPGA YGNYGEGSEPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGp.BA-Inh: h.B-TGF: p.BB—Inh

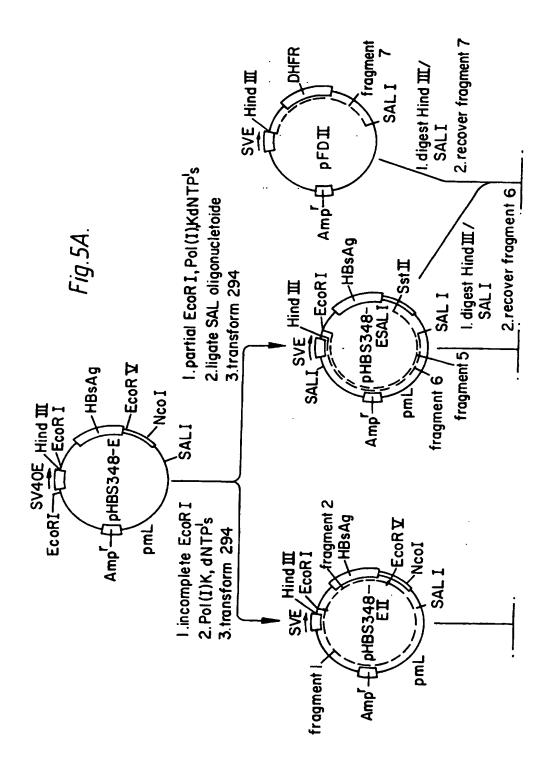
NLKSGCVPTKLRPMSMLYYDDGQNIIKKDIQNMIVEEGGGS SAAPCCVPQALEPLPIVYYV-GRKPKVEQLSNMIVRSGKCS TVNSCOTPTKLSTMSMLMFDDEYNIVKRDVPNMIVEEGGGA p.BA-Inh: h.B-TGF: p.BB-Inh:



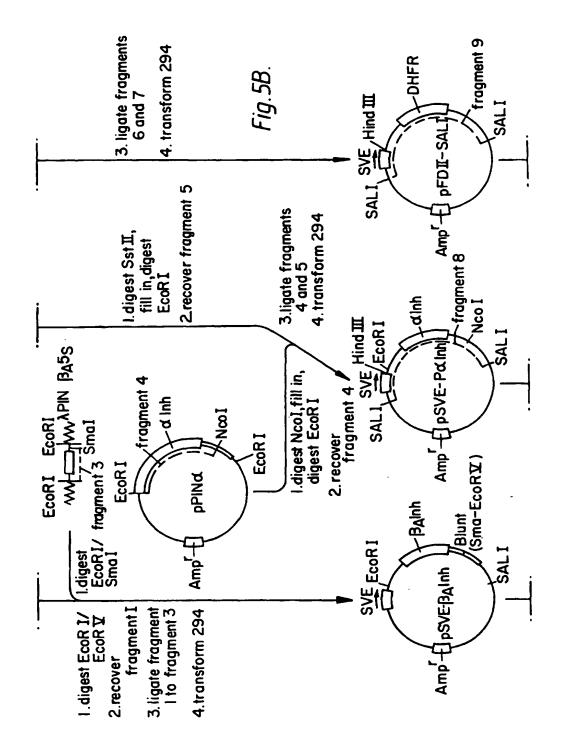
GLECDGKVNI-CKKQFFVSFKDIGWNDWIJAPSGYHANY RPPEEPAVHADOHRASLNISFOELGWDRWIVHPPSFIFHY p. BA-Inh: p. a - Inh:

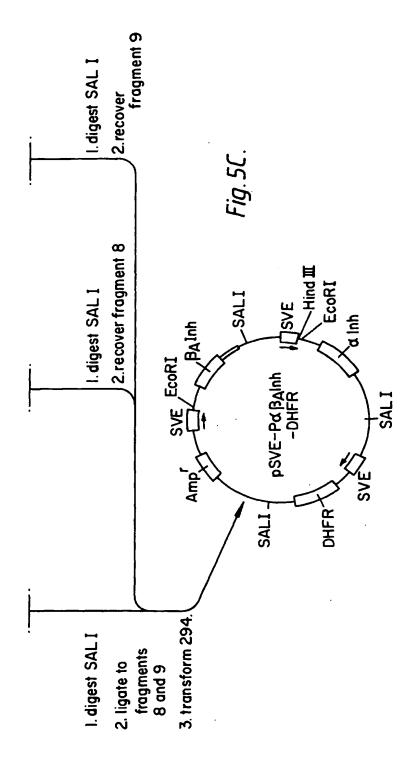
©EGE©PSHIAGTSGSSLSFHSTVINHYRMRGHSPFANLKS ©HGG©GLPTLPNLPLSVPGAPPTPVQPLLLVPGAQ----P 59 p.BA-Inh p. a - Inh:

CONTKLRPMSMLYY--DDGQ-NIIKKDIQNMIVEERGGES COALPGTMRSLRVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHEAGI 95 p.BA-Inh: p.a -Inh:



, Vi





## Fig.6A.

Asp GAT Ala Cie Cie Leu CTG A P Met ATG Leu 76 Ala GCC A)a 75 Asp Val GTG Leu CTG ₽ 17 His GAT Arg AGA Leu CTG နည် ဦည Thr ACG క్షి Ser TCT Ala Leu GCC CTG Le CTC 180 Ala 600 30 AGA ₽e TC Phe TTC 61*y* 130 61*y* 66*A* JE CJE 63 68 86 63e 68e Ala GCT Arg CGA ACC AC Lee CTC Arg AGG <del>೯</del> ೧ 11e ATC £\$ Ses 52 Pro CCT 63 660 Ser TCT Val GTG Leu CTG A)a Glu GAG Phe TC Ser TCA Arg CGG Thr Acc Ala 600 క్రక్ర Leu CTG Ala GCC Arg CGG Gae Gae 55 55 ₽\$. \$\$ 150 CTG CTG 16 16 16 Ala GCA Ser TCA -1 A)a 600 Arg AGG Se 25 Ala GCT G)u GAG 8.9 Ge G Val GTC Val GTC gg gg Leu CTG S. S. Thr Val GTT 61y 66A Asp GAT GJn CAG Ala SCC Cie Cie Leu CTG JE C GJu GAG Ala GCC <u>ရေ</u> Val GTG C S 3 2 5 5 5 5 5 7 5 Ser TCA Ala Arg Glu I Asp Leu CTC GAG GAG Leu CTG Leu CTA Ala GCC Th. 61u GAA 170 770 200 200 5 699 Val GTG 120 CT6 CT6 Tr TGS £ 23 ege GAG Gg Gg His 8 <u>9</u> 63. 661 Arg AGA Glu Leu / GAG CTG ( G1u GAG Arg CGC Ala GCC Arg CGC £5 € 8 £ 23 Leu Leu CTG CTG Asn Ser Ser AAT AGC TCT Arg AGG GJu GAG Ala GCT Ser AGC ಕ್ಷಿಟ್ಟ 15 Le 13 Ser Arg A)a GCT ACC ACC Ser TCT His Ais Leu CTG 61y 666 61. 61. 66. Rys A6 8 <del>I</del> S Val GTG eg Ge His CAT Ser TCC Arg AGG <u>ရှိ</u> Val GTG Ala GCG Asp GAC Ala GCC gg gg Leu 776 See Cle AS Ses Glu GAG Ser 53 A 23 Ser AGC Val GTC ಕ್ಟ ACA ACA Ser TCC Ser TCT Met ATG 점 52 Val 61y 666 품으 కైక్ష Ser Arg CGG 160 His 61*y* A 2 60 Leu TG 110 617 660 660 £22 Ala Phe TC GJn CAG Val GTG Asp GAT 63,5 투증 61 225 375 75 150 8 525

Fig.6B.

Arg AGA Pro CA A) a Pro Leu Met Ser Trp CCC CTG ATG TCC TGG Asn Ile Ser Phe Gln Glu Leu Gly Trp Glu Arg Trp Ile Val Tyr Pro Pro Ser Phe Ile Phe His ARC ATC TCC TCC AG GAG CTG GGC TGG GAA CGG TGG ATC GTG TAC CCT CCC AGT TTC ATC TTC CAC #is CAT Cys His TGC CAC 330 Arg Thr Thr Ser Asp Gly Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Thr Val Pro Asn Leu Leu Thr Gln His (23) CGC ACC ACC TCG GAT GGA GGT TAC TCT TTC AAG TAT GAG ACA GTG CCC AAC CTT CTC ACG CAC (30) Thr Met Arg Pro Leu ACC ATG AGG CCC CTA Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His Ala Asn AGG CCT CCG GAG GAA CCG GCT GCC CAT GCC AAC 190 Val Ala His Thr Arg Thr Arg Pro Pro Ser Gly Gly Glu Arg Ala Arg Arg Ser Thr GTG GCC CAC ACT CGG ACC AGA CCA CCC AGT GGA GGG GAG AGG ACC CGA CGC TCA ACT 300 Ala Gin Pro Cost Cost Ala Ala Leu Pro Gly GCC CAG CCC TGC TGT GCT GCT CTC CCA GGG Ala Leu Arg Leu Leu Gln GCT CTG CGC CTG CTG CAG 61*y* 666 290 Leu Pro ( CTG CCA ( Ser Leu TCC TTG Pro Ser / 7. 7.5 CTG Ser TCT £ 23 8 8 8 eg CAG 210 179 166 Leu 600 CTG ( Tyr 825 TAC Val GTC £ 12 Val GTA A]a 600 675 750 8

335 (EVS) 11e OC\* 1050 (TEX) ATC TAA GGGTGGGGGGTCTTCCTTCTTAATCCCATGGCTGGTGGCCACGCCCCCACCATCATCAGCTGGGAAAAGGCAGAGATTGGGAAATA 1146 GATGGCTCCCACTCCTCCTTTCACTTCTCTGCCTATGGGCTACCCTCCCCACCCCACTTCTATCTCAATAAAGAACACAGTGCATATG polya

## Fig. 7A

| pin.alpha<br>hin.alpha<br>hin.alpha<br>hin.alpha<br>hin.alpha | 20<br>MWPQLLLLLLAPRSGHGCQGPELDRELVLAKVRALFLDALGPPAVTGEGG<br>GVSSQGLELARELVLAKVRALFLDALGPPAVTREGG<br>*** * * * | 40 DPGVRRLPRRHAVGGFMRRGSEPEEE-DVSQAILFPATGARCGDEPAAGE DPGVRRLPRRHALGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCEDKSAARG | 80 LAREAEEGLFTYVFRPSQHTHSRQVTSAQLWFHTGLDRQGMAAANSSGPL LAQEAEEGLFRYMFRPSQHTRSRQVTSAQLWFHTGLDRQGTAASNSSEPL * * * * * * * * * * * * * * * * * * * | 120<br>LDLLALSSRGPVAVPMSLGQAPPRWAVLHLAASALPLLTHPVLVLLLRCP<br>LGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATSALSLLTHPVLVLLLRCP |
|---|---|--|--|---|
|   | pin. alpha  | pin. alpha   | pin.alpha  | pin. alpha  |
|   | hin. alpha  | hin. alpha   | hin.alpha  | hin. alpha  |

## Fig. 7B.

| 200<br>LCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERARRSTAPLP-WPWSPAALRLLQ<br>LCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERARRST-PLMSWPWSPSALRLLQ<br>* ** * | 220 240 260 RPPEEPAVHADCHRASLNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLPTL RPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLHIP | 300 PNLPLSVPGAPPTPVQPLLLVPGAQPCCAALPGTMRSLRVRTTSDGGYSF PNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSF * * * * * * * | 320 334<br>KYETVPNLLTQHCACI<br>KYETVPNLLTQHCACI |
|---|---|---|---|
| pin. alpha  | pin.alpha   | pin.alpha   | pin.alpha                                       |
| hin. alpha  | hin.alpha   | hin.alpha   | hin.alpha                                       |

## Fig.8A.

7.75 5.85 -28 Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys ATG CCC TTG CTT TGG CTG AGA GGA TTT CTG TTG GCA AGT TGC 201 TTTAAAAGGCAATCACAACAACTTTTGCTGCCAGG

10
Ile Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu ATT ATA GG AGG AGT TCC CCC ACC CCA GGA TCC GAG GGG CAC AGC GCG CCC CCC GAC TGC TGC GGG CTG 20 Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn Met GCC CTC CCA AAG GAT GTA CCC AAC TCT CAG CCA GAG ATG GTG GAG GCC GTC AAG AAG CAC ATT TTA AAC ATG Ala GCC 282 357

55° 68€ 40 Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu TTG AAG AAG AGA CCC GAT GTC ACC CAG CCG GTA CCC AAG GCG GCG CTT CTG AAC GCG ATC AGA AAG CTT 70 Lys Val Gly Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu Met Asn AAA GTC GGG GAG AAC GGG TAT GTG GAG ATA GAG GAT GAC ATT GGA AGG AGG GCA GAA ATG AAT 65. 66. His CAC Val GTG 35 35 ₽¥ 432

90 Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile ATG GAG CAG ACC TCG GAG ATC ACG TTT GCC GAG TCA GGA ACA GCC AGG AAG ACG CTG CAC TTC GAG ATT Leu 582 CTT

## Fig.8B.

| Asn<br>AAC         | G1u<br>GAA        | Lys<br>AAG         | Val                | GJ u<br>GAG               | Arg<br>AGA         |
|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| Ala                | 61y<br>666        | Arg<br>CGG         | Asp                | GJu<br>GAA                | His                |
| Lys                | 160<br>Thr<br>ACA | Ala<br>GCT         | 210<br>Leu<br>CTG  | Lys                       | 260<br>Ser<br>TCG  |
| Pro<br>CCC         | Asp               | Asp                | Ser                | Lys<br>AAG                | Gln<br>CAG         |
| Val<br>GTC         | Leu<br>TTG        | Val<br>GTA         | Ser<br>AGC         | Lys<br>AAG                | Glu<br>GAG         |
| Lys                | Ser<br>AGC        | Val<br>GTA         | Lys<br>AAG         | Lys<br>AAG                | Lys<br>AAG         |
| Leu                | 61y<br>660        | Lys<br>AAA         | 61 <i>y</i><br>660 | L'ys<br>AAG               | GJu<br>GAA         |
| 130<br>Phe<br>TTC  | G]n<br>CAG        | 180<br>61u<br>6AA  | Gln<br>CAG         | 230<br>61 <i>y</i><br>66C | G]u<br>GAG         |
| Leu<br>CTC         | Pro<br>CCG        | Ser                | Asp                | Leu<br>CTG                | Asp                |
| Trp<br>TGG         | His               | Leu<br>CTC         | Leu<br>CTG         | Leu                       | A la<br>GCA        |
| Val<br>GTC         | Lys<br>AAG        | Leu<br>TTG         | Leu<br>TTG         | Val                       | 61y<br>66A         |
| G1u<br>GAA         | G1n<br>CAG        | Leu<br>CTG         | Arg<br>CGG         | Leu                       | A la<br>GCA        |
| Ala<br>GCA         | 150<br>61n<br>CAG | Glu<br>GAA         | 200<br>61n<br>CAG  | Ser<br>AGC                | 250<br>G1y<br>GGG  |
| Arg                | G1n<br>CAG        | Ser<br>AGT         | I 1e<br>ATC        | Ala                       | 61 <i>y</i><br>66T |
| G1u<br>GAG         | Phe<br>TTC        | Arg<br>AGG         | Ser                | 61 <i>y</i><br>660        | G]u<br>GAA         |
| Va 1<br>GTG        | Leu               | 61u<br>GAG         | Ser<br>AGC         | Ser<br>AGT                | 61 <i>y</i><br>66T |
| Va 1<br>GTG        | Arg<br>CGC        | 61 <i>y</i><br>666 | Ser<br>TCC         | G1u<br>GAG                | 61 <i>y</i><br>66A |
| 120<br>Ser<br>TCA  | I le<br>ATC       | 170<br>Lys<br>AAG  | Val<br>GTC         | 220<br>Gin<br>CAG         | 61 <i>y</i><br>660 |
| Leu<br>CTG         | Thr               | Leu                | Pro<br>CCT         | % W                       | Lys<br>AAG         |
| Asp<br>GAC         | Val<br>GTC        | 61 <i>y</i><br>660 | Phe<br>TTC         | 61n<br>CAG                | Lys<br>AAG         |
| Ser<br>AGT         | Lys               | Val<br>GTG         | Val<br>GTC         | GAG                       | Lys<br>AA          |
| 61 <i>y</i><br>660 | Thr               | GJu<br>GAA         | His                | 3E                        | 61 <i>y</i><br>666 |
| G]u<br>GAA         | 140<br>Arg<br>AGG | GJu<br>GAG         | 190<br>Trp<br>166  | Ala<br>GCC                | 240<br>G1u<br>GAA  |
| Lys<br>AAG         | Arg Thr A         | Ala                | Thr                | I le<br>ATT               | 61 <i>y</i><br>666 |
| Ser                | Arg<br>AGG        | GJu<br>GAG         | Ser<br>AGC         | Arg                       | G1u<br>GAG         |
| 657                | 732               | 807                | 882                | 957                       | 1032               |
|                    |                   |                    |                    |                           |                    |

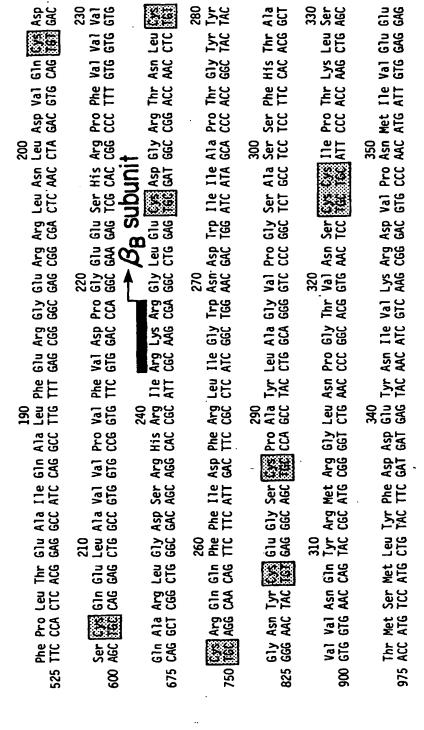
Fig.8C

g 61y Leu 61u Gys Asp 390 Met Ile Val Glu Glu GVS GIY CVS Ser AM\* ATG AGTTGCCCAGGGGGAAAGGGAGCAAGAGTTGTCCAGAGAAGACAGTG 310 Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile TTC AAG GAC ATC GGC TGG AAT GAC TGG ATC ATT 360 His Ser Pro Phe Ala Asn Leu Lys Ser CYS CAT AGC CCC TTT GCC AAC CTC AAA TCG KGS Ile A∏e Thr Ser Gly Ser Ser ACG TCC GGG TCC TCA Asp GAC Lys Ag Rys & 11e ATC 330 Ser His Ile Ala Gly T 3 AGC CAT ATA GCA GGC A Asn Ile AAC ATC His Arg Arg Arg Arg CAT CGC CGG CA 5380 1570 GCAAAATGAAGAAATTTTAAGGTTTCTGAGTTAACCAGAAAAATAGAAATTAAAAACAAAACA polya 61y 66T Asp GAT 350 Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly TCA ACA GTC ATC AAC CAC TAC CGC GGC 320 Asn Tyr Cyr Glu Gly Glu Cys Pro AAC TAC TEC GAG GGT GAG TSC CCG Asp GAT TŞT TAT 270 Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro CTC ATG CTG CAG GCC CGG CAG TCT GAA GAC CAC CCT Ser AGT 290
Val Asn Ile Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val
GTC AAC ATC TRC TEST AAG AAA CAG TTC TTT GTC 도 동 Leu TTG 370 Pro Met Ser Met L CCC.ATG TCC ATG T His Ala Leu Arg CTG AGA Pro Thr Lys I ₹¥ 340 Phe His TTC CAC 69 667 Ser TCT ₽ 110 52 Val GTG Asn Lys Ag Ser TCC r CC 63 660 Ala GCT Leu CTG 35 cag Cag 1182 1332 1257 1107

### Fig. 94.

| 30<br>Val<br>6TG        | Met<br>ATG                 | 80<br>613<br>660   | Ala<br>GCC         | 130<br>Leu<br>CTG  | Phe<br>TTC        | 180<br>Thr<br>ACC   |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| A da<br>GCG             | Ala<br>GCC                 | Asp<br>GAC         | Leu<br>CTC         | Ser<br>AGC         | Tyr               | His                 |
| Glu                     | Ala<br>GCC                 | Leu<br>CTC         | 61y<br>660         | Ala<br>GCC         | Val<br>GTG        | Trp<br>766          |
| Leu<br>CTG              | Lys                        | His                | Asp<br>GAT         | Gln<br>CAG         | Lys<br>AA         | 61y<br>660          |
| Phe<br>TTC              | 555                        | Pro<br>cc6         | Thr                | Va 1<br>GTC        | Val<br>GTC        | Ser<br>AGC          |
| Asp<br>GAC              | 50<br>Va 1<br>GTG          | 11e<br>ATC         | 100<br>Glu<br>GAG  | Val<br>GTG         | 150<br>Arg<br>CGG | Arg<br>CGC          |
| 61 <i>y</i><br>660      | Ala<br>GCC                 | G]u<br>GAG         | Ala<br>GCC         | Phe<br>TTT         | Val<br>GTG        | Lys<br>AAG          |
| Asp                     | His                        | Va 1<br>GTG        | Phe<br>TTC         |                    |                   |                     |
| Arg Val                 | ACG ACG                    | Arg                | Ser<br>AGC         | Asn                |                   |                     |
| Arg<br>CGA              | 11e<br>ATC                 | 61y<br>660         | 11e<br>ATC         | G1n<br>CAG         | Arg<br>CGG        | Val<br>GTG          |
| 20<br>613<br>667<br>667 | Asn Ile Thr<br>AAC ATC ACG | 70<br>Asp<br>GAC   | I 1e<br>ATC        | 120<br>Asn<br>AAC  | Ser               | 170<br>Arg<br>AGG   |
| Leu                     | 500                        | Glu<br>GAG         | Glu<br>GAA         | 61 <i>y</i><br>660 | 61y<br>660        | Lys<br>AAG          |
| G1u<br>GAG              | Arg<br>CGG                 | Arg                |                    | G1u<br>GAA         | Lys<br>AAG        |                     |
| Glu<br>GAG              | 61y<br>66C                 | Val<br>GTG         | Val<br>GTT         | Asn                |                   |                     |
| or<br>S                 | Arg<br>CGG                 | Lys                | Arg                | Ser<br>TCC         | Leu<br>CTG        |                     |
| Arg<br>CGG              | 40<br>Met<br>ATG           | 61 <i>y</i><br>660 | 90<br>Glu<br>GAG   | I 1e<br>ATC        | 140<br>Val<br>GTC | Asn                 |
| Arg<br>CGG              | G]n<br>CAG                 | A1a<br>6CG         | Gln<br>CAG         | Phe<br>TTC         | Tyr               | 7.7<br>7.65         |
| Phe<br>TTC              | Leu<br>CTG                 | His                | 61 <i>y</i><br>660 | Phe<br>TTC         | r<br>S            | Arg<br>AGG          |
| 61 <i>y</i><br>660      | Arg                        | Leu<br>CTG         | Asp<br>GAC         | Tyr<br>TAC         | Leu<br>CTG        | Asp<br>GAC          |
| ദി<br>റേ                | Ser<br>AGC                 | Lys<br>AAG         | Ala                | Leu                | Leu               | 6:1 <i>y</i><br>66T |
| 288                     | Leu<br>TTG                 | 60<br>Arg<br>CGC   | 61y<br>660         | 110<br>Arg<br>CGC  | Lys               | 160<br>His<br>CAC   |
| Ser<br>TCG              | I 1e<br>ATC                | Leu<br>CTG         | ဦး                 | Val<br>GTC         | Leu<br>CTG        | 61 <i>y</i>         |
| Thr<br>Acc              | His                        | Ala<br>GCC         | Ser<br>AGC         | Arg<br>CGG         | Tyr               | G1n<br>CAG          |
| ~ <b>X 3</b>            | Arg<br>CGG                 | Thr                | A la<br>GCC        | Ser<br>TCC         | Leu<br>CTT        | 61u<br>6A6          |
| 1 65                    | Lys<br>AAG                 | Val<br>GTC         | His                | Ser<br>TCC         | 1rp<br>166        | 6<br>6<br>6         |
| 1                       | 75                         | 150                | 225                | 300                | 375               | 450                 |
|                         |                            |                    |                    |                    |                   |                     |

### Fig.9B



### Fig.9C

### This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

| ☐ BLACK BORDERS   |
|---|
| ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES                 |
| ☐ FADED TEXT OR DRAWING                                 |
| ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING                  |
| ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES                                 |
| ☑-COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS                  |
| ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS                                  |
| LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT                     |
| ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY |
| Потнер.   |

### IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.